



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ: ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ

ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΕΙΔΩΝ
ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ ΣΕ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ**

ΣΤΕΡΓΙΟΥ ΗΛΙΑΝΑ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΕΙΔΩΝ
ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ ΣΕ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ**

**DEVELOPMENT OF MOLECULAR MARKERS FOR SPECIES IDENTIFICATION AND DIS-
CRIMINATION AND DETECTION OF POSSIBLE ADMIXTURES IN FOOD OF ANIMAL
ORIGIN**

Στεργίου Ηλιάνα

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

<i>ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ :</i> <i>(ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)</i>	<i>Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του</i> <i>Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του</i> <i>Πανεπιστημίου Θεσσαλίας</i>
<i>ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ</i>	<i>Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας</i> <i>Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και</i> <i>Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας</i>
<i>ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ</i>	<i>Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας</i> <i>Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας</i> <i>και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου</i> <i>Θεσσαλίας</i>

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	8
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.ΤΟ ΚΡΕΑΣ.....	10
1.1 ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΡΕΑΤΟΣ.....	10
1.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΓΟΡΑ ΚΡΕΑΤΟΣ.....	11
1.3 Η ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΚΡΕΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥ.....	11
1.4 ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΚΡΕΑΤΟΣ.....	12
2. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΕΣ ΧΟΙΡΩΝ.....	14
3. ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ ΚΑΙ ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΡΕΑΤΟΣ.....	21
3.1 ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ.....	22
3.2 ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑ.....	23
3.3 ΑΥΘΕΝΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΡΕΑΤΟΣ.....	25
4. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	27
4.1 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA /16S rRna.....	30
4.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	32
5. ΣΚΟΠΟΣ.....	38
6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39
6.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	39
6.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....	40
6.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA.....	41
6.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	43
6.5 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	46

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
7.1 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA.....	47
7.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR.....	47
7.3 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ.....	48
7.4 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΛΩΝ	50
8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κρέας, λόγω της ιδιαίτερα υψηλής διατροφικής του αξίας κατέχει σημαντική θέση στις προτιμήσεις των καταναλωτών. Η αυξημένη κατανάλωση και ζήτηση του κρέατος και των προϊόντων του, έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής, εμπορίας και διακίνησης τεράστιων ποσοτήτων σε όλο τον κόσμο. Δημιουργούνται, βέβαια, μεγάλα κέρδη γύρω από αυτά τα προϊόντα. Τα οικονομικά αυτά οφέλη αποτέλεσαν λόγο για την εμφάνιση ενός συχνού φαινομένου στη βιομηχανία του κρέατος, τη νοθεία του και τη παραπλάνηση των καταναλωτών.

Η νοθεία του κρέατος αποτελεί μείζον ζήτημα, για τους καταναλωτές αλλά και για τις υγιείς επιχειρήσεις από οικονομική, θρησκευτική, ηθική και διατροφική άποψη. Έτσι, η επιλογή του καταναλωτή θα πρέπει να βασίζεται σε τεκμηριωμένη ενημέρωση για τα προϊόντα που επιλέγει να καταναλώσει. Συνεπώς, προς τη κατεύθυνση αυτή, η σωστή επισήμανση και ιχνηλασιμότητα του κρέατος και των προϊόντων του έχει μεγάλη σημασία για τη σωστή εμπορία των προϊόντων αλλά και για την σωστή ενημέρωση των καταναλωτών.

Κάθε χρόνο, καταναλώνονται τεράστιες ποσότητες ερυθρού κρέατος, οπότε η νοθεία αυτού και των προϊόντων του με φθηνότερα ή κατώτερης ποιότητας είδη κρέατος, δημιουργούν μεγάλο πρόβλημα στους καταναλωτές αλλά και στη βιομηχανία κρέατος. Για το λόγο αυτό, χρειάζονται αποτελεσματικές τεχνικές για την ταυτοποίηση των ειδών κρέατος, τόσο για τους καταναλωτές, όσο και για τους υπεύθυνους της εμπορίας κρέατος. Έτσι, τις καθιστά χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο της νοθείας σε προϊόντα κρέατος.

Στη παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές για τη ταυτοποίηση και τη διάκριση του χοιρινού κρέατος που προέρχεται από τη φυλή του ελληνικού μαύρου χοίρου. Πραγματοποιήσαμε μια σειρά πειραμάτων με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές για την ανίχνευση της φυλής – στόχου (κρέας μαύρου χοίρου), σε τυποποιημένα κρεατοπαρασκευάσματα στα οποία αναγραφόταν η ύπαρξη ποσοστού κρέατος από μαύρο χοίρο. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο μιτοχονδριακό

DNA που απομονώθηκε από τον ιστό των σκευασμάτων αυτών. Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν η PCR. Όπου, ενισχύθηκαν με τη μέθοδο της PCR, τμήματα των γονιδίων Cytb και COXIII.

Η μέθοδος αυτή κρίθηκε αρκετά αποτελεσματική για την ανίχνευση κρέατος της φυλής - στόχου σε τυποποιημένα κρεατοσκευάσματα.

ABSTRACT

Because of its particularly high nutritional value, meat has an important role to play in consumer preferences. The increased consumption and demand of meat and its products has resulted in increased production, marketing and distribution of huge quantities around the world. Of course, big profit is made of these products. These economic benefits have meant the occurrence of a common phenomenon in the meat industry, its falsification and misleading the consumers.

Meat fraud is a major issue for consumers but also for healthy businesses from an economic, religious, moral and nutritional point of view. Thus, consumer choice should be based on factual information about the products they choose to consume. In this respect, proper labeling and traceability of meat and its products is of great importance for the proper marketing of products and also for the proper informing of consumers.

Every year, huge quantities of red meat are consumed, so adulteration of meat and its products with cheaper or inferior meat products is a major problem, for both the consumers and the meat industry. For this reason, effective techniques are needed for the identification of meat, both for consumers and for those responsible for the meat market. Those are useful tools for controlling fraud in meat products.

In this study, molecular techniques were applied to identify and distinguish common pork from the breed of Greek black pig. We conducted a series of experiments with specially designed primers for the detection of the target breed (Greek black pig meat) in standardized cured meat products which indicated the presence of a percentage of black pig meat. The analysis was performed on mitochondrial DNA which was isolated from the tissue of these products. The PCR technique was applied with which parts of the CytB and COXIII genes were amplified.

This method was considered effective enough to detect target breed meat in standardized cured meat products.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου για την ανάθεση και εκπόνηση αυτής της εργασίας, αλλά και για τη στήριξη, τη συμπαράσταση και κατανόηση του. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, κα. Αικατερίνη Μούτου και την Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, κα. Θεολογία Σαραφίδου, για τη συμμετοχή τους στη τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Ιδιαίτέρως, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον κ. Κωνσταντίνο Σταμάτη, Ε.ΔΙ.Π του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, για την αμέριστη στήριξη, βοήθεια και καθοδήγηση του, καθ' όλη τη διάρκεια υλοποίησης της πτυχιακής εργασίας μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Διδάκτορες Ανδρέα Τσιπουρλιάνο, Θεμιστοκλή Γιαννούλη, Μαρία Μαρκαντώνη και Ελένη Γαλλιοπούλου, για τη πολύτιμη βοήθεια τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων σε όλα τα στάδια της διατριβής μου, καθώς και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που επικρατούσε μέσα στο εργαστήριο.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου, την αδελφή μου και τη γιαγιά μου για την αμέριστη ηθική και υλική υποστήριξή τους καθώς και τους φίλους μου για τη συμπαράσταση τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.ΤΟ ΚΡΕΑΣ

Βασικό είδος της διατροφής του ανθρώπου από τους προϊστορικούς ακόμα χρόνους αποτέλεσε το κρέας. Με τον όρο κρέας, ορίζεται το σύνολο των ζωικών ιστών, που είναι κατάλληλη για ανθρώπινη βρώση. Συγκεκριμένα, ως κρέας ορίζεται η σάρκα των θερμόαιμων ζώων και πτηνών, που αποτελείται κυρίως από μυϊκό ιστό και η οποία μετά τη σφαγή του ζώου / πτηνού, έχει υποστεί μεταθανάτιες βιοχημικές μεταβολές που τη καθιστούν τρυφερή και εύγευστη (Μπλούκας Ι.,2007). Τα εκτρεφόμενα είδη των θερμόαιμων ζώων, τα οποία αποτελούν και τη κύρια πηγή κρέατος για τις ανεπτυγμένες χώρες είναι τα βοοειδή, οι χοίροι, τα πρόβατα και οι αίγες, ενώ τα εκτρεφόμενα πουλερικά είναι οι όρνιθες, οι γαλοπούλες, οι πάπιες και οι χήνες. Το βοδινό/μοσχάρι, το χοιρινό και το αιγοπρόβειο κρέας χαρακτηρίζονται ως ερυθρά κρέατα, ενώ το κρέας των πουλερικών ως λευκό κρέας. Εντούτοις, ανάλογα με τις τοπικές συνήθειες, διάφορες χώρες του κόσμου καταναλώνουν και άλλα είδη κρέατος από άλλα είδη εκτρεφόμενων ζώων ή μη (άλογο και είδη κυνηγιού).

Το κρέας και τα προϊόντα του, σε σύγκριση με άλλα τρόφιμα, βρίσκονται σε υψηλή θέση προτίμησης από τους καταναλωτές λόγω των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του (χρώμα, γεύση, οσμή) και της υψηλής περιεκτικότητας του σε θρεπτικά συστατικά (Γούλας Παναγιώτης, 2002). Επιπλέον, αποτελεί ένα από τα λίγα τρόφιμα που δημιουργεί, τόσο γρήγορα, όσο και αποτελεσματικά το αίσθημα του κορεσμού. Αποτελεί εξαιρετική πηγή πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας, ιχνοστοιχείων (σίδηρο, ψευδάργυρο) και βιταμινών (βιταμίνες του συμπλέγματος Β). Αξίζει να σημειωθεί ότι, αποτελεί μια από τις λίγες αξιόλογες πηγές βιταμίνης Β12 και του αμινοξέος λυσίνη καθώς και άλλες ουσίες όπως το λινελαϊκό οξύ με ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου (Γεωργάκης Σπ.Α., 2005).

1.1 ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΡΕΑΤΟΣ

Τα τρόφιμα τα οποία παράγονται από κρέας, δηλαδή το σύνολο των ζωικών ιστών που είναι κατάλληλη για ανθρώπινη βρώση με την εφαρμογή κατάλληλων τεχνολογικών μεθόδων επεξεργασίας, χαρακτηρίζονται ως προϊόντα κρέατος. Τα προϊόντα κρέατος διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες με βάση τον τρόπο επεξεργασίας τους: α) Σε επεξεργασμένα προϊόντα όπως τα ωμά λουκάνικα, κονσέρβες κρέατος κ.α., β) Σε αναδομημένα νωπά προϊόντα (γύρος, μπιφτέκια, σουβλάκια κ.α.) και γ) Σε εδωδιμα υποπροϊόντα κρέατος (εκχυλίσματα κρέατος, ζωμοί κ.α.)

1.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΓΟΡΑ ΚΡΕΑΤΟΣ

Το κρέας αποτελεί ένα εκ των κυριότερων ειδών διατροφής για το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού της γης. Ωστόσο, διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν σημαντικά τη προτίμηση του καταναλωτή και τη ποσότητα που καταναλώνει. Οι σημαντικότεροι παράγοντες είναι (Μπλούκας Ι., 2007):

- Η τιμή πώλησης του κρέατος, τόσο μεταξύ των διαφορετικών ειδών κρέατος, όσο και σε σύγκριση με τις τιμές των υποκατάστατων ή συμπληρωματικών προϊόντων κρέατος.
- Το βιοτικό επίπεδο και το εισόδημα των καταναλωτών.
- Οι νέες τάσεις στη σύγχρονη διατροφή, που υποστηρίζουν ότι το κρέας δεν αποτελεί μια τόσο υγιεινή διατροφική επιλογή ιδιαίτερα σε μεγάλες ποσότητες.
- Οι θρησκευτικές και οι κοινωνικές πεποιθήσεις.
- Οι συνθήκες εκτροφής των ζώων.
- Η μεταχείριση των ζώων πριν και κατά τη διάρκεια της σφαγής τους.
- Η εμφάνιση του κρέατος κατά την αγορά του.
- Τέλος, απρόβλεπτα γεγονότα όπως διάφορα διατροφικά σκάνδαλα που κατά καιρούς έχουν επηρεάσει έστω και πρόσκαιρα την αγορά κρέατος.

1.3 Η ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΚΡΕΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥ

Από τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, το κρέας και τα προϊόντα του, σε παγκόσμιο επίπεδο, αντιπροσωπεύουν ένα κολοσσιαίο οικονομικό κεφάλαιο. Η παραγωγή κρέατος, σε όσες χώρες είναι πλεονασματική, βοηθάει σημαντικά την εθνική τους οικονομία. Στην Ελλάδα όμως, η παραγωγή δεν καλύπτει την κατανάλωση και έτσι υποχρεώνεται να εισάγει κρέατα και γενικότερα προϊόντα ζωικής προέλευσης από άλλες χώρες. Στη χώρα μας, από τους τέσσερις κλάδους της κτηνοτροφικής παραγωγής, η παραγωγή βόειου κρέατος κατέχει την τέταρτη θέση, διότι η χώρα μας παράγει χαμηλό ποσοστό. Στη τρίτη θέση, βρίσκεται η χοιροτροφία η οποία αναπτύχθηκε ιδιαίτερα από το 1990 και μετά από μελέτες, φάνηκε ότι πλησίαζε να καλύψει σε ποσοστό 91% τις ανάγκες σε χοιρινό κρέας. Όμως, λόγω των διάφορων διατροφικών σκανδάλων που αφορούσαν τα βοοειδή και τα πουλερικά, το καταναλωτικό κοινό στράφηκε στη κατανάλωση χοιρινού κρέατος με αποτέλεσμα η παραγωγή να καλύπτει μόνο το 41% της ζήτησης. Για να καλυφθούν οι ανάγκες λοιπόν σε χοιρινό κρέας εισάγονται μεγάλες ποσότητες από

τις χώρες της Ε.Ε.. Στη δεύτερη θέση, βρίσκεται η προβατοτροφία, όπου καλύπτει σε ποσοστό 84% τις ανάγκες σε κρέας. Στη πρώτη θέση, βρίσκονται τα πουλικά όπου καλύπτουν τη χώρα μας σε ποσοστό κρέατος 86%. Η συνολική κατανάλωση κρέατος, από το 1962 μέχρι το 1996, αυξήθηκε σε παγκόσμιο επίπεδο κατά 50% περίπου (F.A.O), στην Ε.Ε. κατά 11% και στην Ελλάδα κατά 30%. Στην χώρα μας η κατανάλωση κρέατος, δεν ακολούθησε ομαλή πορεία. Αμέσως μετά το Β΄ Παγκόσμιο πόλεμο αυξήθηκε σημαντικά η κατανάλωση και στη συνέχεια ακολούθησε μια περίοδος σχετικής ηρεμίας όπου τη διαδέχθηκε μια προοδευτικά αυξανόμενη μείωση, της οποίας τα αίτια ήταν ποικίλα. Τη δεκαετία 1960-1970 η συνολική κατανάλωση κρέατος ανά άτομο ετησίως ήταν στο 56,94kg ενώ το 2000 87,8kg (F.A.O 2001). Στη χώρα μας γενικά, η κατανάλωση κρέατος, παρά τη τεράστια αύξηση των προηγούμενων δεκαετιών, υπολείπεται ακόμα της μέσης Ευρωπαϊκής λόγω κλίματος, φυσικού περιβάλλοντος και γενικότερης διατροφικής κουλτούρας (Γεωργάκης Σπ.Α., 2005).

1.4 ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΚΡΕΑΤΟΣ

Το κρέας και ιδιαίτερα το άπαχο, αποτελεί βασικό συστατικό της διατροφής του ανθρώπου. Όταν το κρέας καταναλώνεται σε φυσιολογικές ποσότητες με αρκετή ποσότητα φυτικών ινών, παρέχει στον οργανισμό πολύτιμα θρεπτικά συστατικά. Τη θρεπτική αξία του κρέατος αποτελούν οι πρωτεΐνες, τα λίπη, οι βιταμίνες και τα ιχνοστοιχεία. Όσο αναφορά, τις βιταμίνες και τα λιπαρά οξέα τα προσλαμβάνουμε κατά κύριο λόγο από άλλα τρόφιμα για να έχουμε μια ισορροπημένη διατροφή. Μερικά όργανα όμως, όπως το συκώτι αποτελούν μια άριστη πηγή για τις βιταμίνες Α και Β1. Στο βοδινό/μοσχάρι κρέας, τα βασικά αμινοξέα έχουν υψηλό ποσοστό σε λευκίνη, λυσίνη, βαλίνη σε σχέση με το χοιρινό και το αιγοπρόβριο κρέας και μικρότερο ποσοστό σε θρεονίνη. Αυτό βέβαια, εξαρτάται από τη φυλή και την ηλικία του ζώου, όπου υπάρχουν διαφορές στους διάφορους μυς του σώματος. Από ποικίλες έρευνες, αποδείχτηκε ότι τα ποσοστά αργινίνης, ισολευκίνης και φαινυλαλανίνης αυξάνουν σε σχέση με άλλα αμινοξέα με την αύξηση της ηλικίας. Το περιεχόμενο των αμινοξέων μπορεί να επηρεασθεί από τη διαδικασία επεξεργασίας του κρέατος (Γούλας Παναγιώτης, 2002). Στον πίνακα 1.4.1, παρατίθεται η περιεκτικότητα αμινοξέων σε τρία είδη κρέατος :

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.4.1: Περιεχόμενο απαραίτητων αμινοξέων σε νωπά κρέατα (% των συνολικών πρωτεϊνών) (Γούλας Παναγιώτης, 2002)

ΑΜΙΝΟΞΕΑ (στα 50gr)	ΒΟΔΙΝΟ/ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟ	ΧΟΙΡΙΝΟ	ΑΙΓΟΠΡΟΒΕΙΟ
Ισολευκίνη	5.1	4.9	4.8
Λευκίνη	8.4	7.5	7.4
Λυσίνη	8.4	7.8	7.6
Μεθειονίνη	2.3	2.5	2.3
Κυστίνη	1.4	1.3	1.3
Φαινυλαλανίνη	4.0	4.1	3.9
Θρεονίνη	4.0	5.1	4.9
Τρυπτοφάνη	1.1	1.4	1.3
Βαλίνη	5.7	5.0	5.0
Αργινίνη	6.6	6.4	6.9
Ιστιδίνη	2.9	3.2	2.7

Το κρέας περιέχει επίσης και πολλά μακροστοιχεία και μικροστοιχεία. Από αυτά το κάλιο, ποσοτικά είναι το πλέον σημαντικό και ακολουθείται από το φώσφορο. Στον πίνακα 1.4.2 θα αναφέρουμε το περιεχόμενο μακροστοιχείων και μικροστοιχείων σε τρία είδη κρέατος:

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.4.2: Περιεχόμενο μακροστοιχείων και μικροστοιχείων στο νωπό κρέας (στα 100gr κρέατος) (Γούλας Παναγιώτης, 2002)

ΕΙΔΟΣ ΚΡΕΑΤΟΣ (στα 100gr)	ΜΑΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ			ΜΙΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ		
	K	Na	Ca	Mg	Fe	P
ΒΟΔΙΝΟ	334	69	5.4	24.5	4.3	276
ΧΟΙΡΙΝΟ	400	45	4.3	26.1	1.4	223
ΑΙΓΟΠΡΟΒΙΟ	246	75	12.6	18.7	1.0	173

Το κρέας περιέχει και ένα σημαντικό ποσοστό σε βιταμίνες. Η ποσότητα της βιταμίνης B1 στο χοιρινό, είναι σημαντικά υψηλή σε σχέση με άλλα είδη κρέατος και η ποσότητα φολικού οξέος, ιδιαίτερα αυξημένη στο βοδινό/μοσχαρίσιο κρέας. Στον πίνακα 1.4.3 θα αναφέρουμε το περιεχόμενο βιταμινών σε τρία είδη κρέατος:

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.4.3: Περιεχόμενο βιταμινών στο νωπό κρέας (στα 100gr) (Γούλας Παναγιώτης, 2002)

ΕΙΔΟΣ ΚΡΕΑΤΟΣ (στα 100gr)	B1	B2	B6	B12	A	C
ΒΟΔΙΝΟ/ΜΟΣΧΡΙΣΙΟ	100	260	380	2.7	20	1
ΧΟΙΡΙΝΟ	700	360	420	0.8	10	1
ΑΙΓΟΠΡΟΒΙΟ	150	250	400	2	ίχνη	ίχνη

Το κρέας περιέχει ένα ποσοστό πρωτεΐνης και λίπους. Το οποίο ανάλογα με το είδος του κρέατος ποικίλει. Κάθε ποσότητα που καταναλώνουμε αποδίδει και την ανάλογη ενέργεια. Στον πίνακα 1.4.4 θα αναφέρουμε το περιεχόμενο λίπους και αποδιδόμενης ενέργειας σε τρία είδη κρέατος:

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.4.4: Περιεχόμενο πρωτεϊνών, λίπους και η αποδιδόμενη ενέργεια σε τρία είδη κρέατος στα (στα 100gr)(Γούλας Παναγιώτης, 2002)

ΕΙΔΟΣ ΚΡΕΑΤΟΣ (στα 100gr)	ΠΡΩΤΕΙΝΗ(%)	ΛΙΠΟΣ(%)	ΕΝΕΡΓΕΙΑ kcal(100gr)
ΒΟΔΙΝΟ/ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟ	20	5	102
ΧΟΙΡΙΝΟ	21	7	330
ΑΡΝΙΣΙΟ	12.5	15	374
ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ	12.5	4.2	274

2. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΕΣ ΧΟΙΡΩΝ

Οι χοίροι που εκτρέφονται σήμερα ανήκουν στο υποείδος *Sus scrofa domestica* (Linnaeus, 1758). Το υποείδος *S. scrofa domestica* προήλθε από την εξημέρωση και διασταύρωση ατόμων που ανήκαν στα ακόλουθα τρία υποείδη άγριων χοίρων: (Κατσαούνης Ν.Κ., Σπαής Α.Β., 1998)

- *Sus scrofa scrofa*, πρόκειται για τον αγριόχοιρο της Ευρώπης και της βόρειας και δυτικής Ασίας.

- *Sus scrofa vittatus*, πρόκειται για τον αγριόχοιρο της νοτιοανατολικής Ασίας.
- *Sus scrofa leucomystax*, πρόκειται για τον αγριόχοιρο της Ιαπωνίας.

Γεννήτορες των τριών αυτών υποειδών είναι δυνατόν να συζευχθούν μεταξύ τους, καθώς και με εξημερωμένους χοίρους και να δώσουν γόνιμους απογόνους.

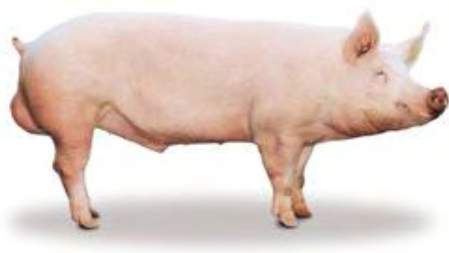
1. Ο ευρωπαϊκός αγριόχοιρος ήταν άλλοτε πολύ διαδομένος σε ολόκληρη την Ευρώπη, καθώς και στη βόρεια και στη δυτική Ασία. Από τον ευρωπαϊκό αγριόχοιρο, κατάγονται οι κέλτικου και ιβηρικού τύπου εξημερωμένοι χοίροι, καθώς και ο εγχώριος γηγενής πληθυσμός της Ελλάδας.
2. Ο ασιατικός αγριόχοιρος, είναι διαδομένος κυρίως στη νοτιοανατολική Ασία. Από τον ασιατικό αγριόχοιρο κατάγονται οι κινέζικες και ινδοκινέζικες φυλές εξημερωμένων χοίρων.

Όλες οι γνωστές φυλές χοίρων εξελίχθηκαν από τον ευρωπαϊκό και τον ασιατικό αγριόχοιρο.

Οι χοίροι ανήκουν σε ένα πολυτυπικό είδος, το περισσότερο παμφάγο σε σύγκριση με οποιοδήποτε άλλο παραγωγικό ζώο. Τα χαρακτηριστικά αυτά συντέλεσαν στο να δημιουργηθεί, στις χώρες όπου συνηθίζεται η κατανάλωση χοιρινού κρέατος, ένας μεγάλος αριθμός φυλών. Μεταξύ των φυλών που δημιουργήθηκαν, ορισμένες εξαιτίας της υψηλής παραγωγικής ικανότητας των ζώων τους και κυρίως, της δυνατότητας να αποδίδουν σφάγια, που ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις των σύγχρονων καταναλωτών, έχουν διαδοθεί σε όλες τις αναπτυγμένες ζωοτεχνικά χώρες. Θα δώσουμε μια σύντομη περιγραφή των φυλών αυτών που έχουν εισαχθεί και στη χώρα μας και στη συνέχεια θα περιγράψουμε τον ελληνικό μαύρο χοίρο (Κατσαούνης Ν.Κ., Σπαής Α.Β., 1998).

1. Φυλή Large White

Η φυλή Large White δημιουργήθηκε στα μέσα του 19^{ου} αιώνα στην Αγγλία. Είναι αποτέλεσμα πολλαπλών διασταυρώσεων και αυστηρής επιλογής. Είναι μία φυλή η οποία παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Διαθέτει μεγαλόσωμα ζώα με αναπτυγμένες μυϊκές μάζες και η απόδοση σε σφάγιο χοίρων με Σ.Β : 90-100kg κυμαίνεται γύρω στο 71%. Ο χρωματισμός του δέρματος και του τριχώματος είναι τελείως λευκός.



Εικόνα 2.1 : Φυλή Large White (Κατσαούνης Ν.Κ., Σπαής Α.Β., 1998)

2. Φυλή Landrace

Η φυλή Landrace δημιουργήθηκε στη Δανία στο τέλος του 19^{ου} αιώνα. Είναι προϊόν διασταύρωσης αγγλικών κάπρων Large White με δανέζικες χοιρομητέρες κέλτικου τύπου, το οποίο σταθεροποιήθηκε και βελτιώθηκε με πολύ αυστηρή επιλογή. Η όλη διάπλαση του σώματος είναι εκείνη των χοίρων υψηλής παραγωγικής ικανότητας. Η ράχη και η οσφύς είναι μακριές και το χαρακτηριστικό της δανέζικης φυλής αυτής είναι ότι τα ζώα διαθέτουν 16 ζεύγη πλευρών. Η απόδοση σε σφάγιο χοίρων με Σ.Β : 90-100kg κυμαίνεται γύρω στο 72,7%. Ο χρωματισμός του δέρματος και του τριχώματος είναι ομοιόμορφος λευκός χωρίς κανένα στίγμα. Αποτελεί το «τέλειο χοίρο» και μαζί με τη Large White αποτελούν τη βάση των περισσότερων διασταυρώσεων.



Εικόνα 2.2 : Φυλή Landrace (Κατσαούνης Ν.Κ.- Σπαής Α.Β., 1998)

3. Φυλή Pietrain

Η φυλή Pietrain δημιουργήθηκε στο Βέλγιο γύρω στο 1920. Η ακριβής προέλευση της δεν είναι ακόμα γνωστή. Κύριο χαρακτηριστικό της είναι η υπερβολική ανάπτυξη των μυϊκών μαζών της ωμοβραχιόνιας χώρας, της ράχης και κυρίως του οπίσθιου τμήματος του σώματος. Αποδίδει πολύς καλής ποιότητας σφάγια σε ποσοστό 80.2 %, που ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις των καταναλωτών που προτιμούν χοιρινό άπαχο κρέας. Ο χρωματισμός είναι κατά ζώνες λευκός και

λευκόφαιος και σε ολόκληρο το σώμα υπάρχουν διάσπαρτες, διαφορετικής έκτασης μαύρες κηλίδες.



Εικόνα 2.3 : Pietrain (Κατσαούνης Ν.Κ. – Σπαής Α.Β., 1998)

4. Φυλή Hampshire

Η φυλή Hampshire δημιουργήθηκε στην Αγγλία τον 19^ο αιώνα. Κατόπιν έγιναν εξαγωγές γεννητόρων στις Η.Π.Α, όπου η εκτροφή των χοίρων της φυλής αυτής διαδόθηκε πολύ και η παραγωγικότητα τους βελτιώθηκε σημαντικά. Σήμερα εκτρέφονται σε πολλές χώρες καθαρόαιμοι χοίροι Hampshire, αλλά κυρίως ως βελτιωτές της ποιότητας του σφάγιου σε διάφορα σχήματα διασταυρώσεων. Πρόκειται για ζώο με ικανοποιητικά αναπτυγμένη μυϊκή μάζα. Αποδίδει σφάγια πολύς καλής ποιότητας σε ποσοστό 55,2%. Οι χοίροι Hampshire εκτρέφονται κατά βάση για τη παραγωγή γεννητόρων που θα χρησιμοποιηθούν ως τελικοί κάπροι σε διάφορα σχήματα διασταυρώσεων για τη βελτίωση της ποιότητας του σφάγιου. Ο χρωματισμός είναι μαύρος με μια λευκή περιμετρική ζώνη στο ύψος του ακρωμίου το πλάτος της οποίας ποικίλλει.

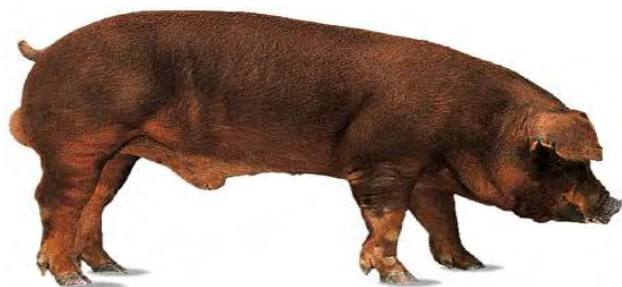


Εικόνα 2.4 : Φυλή Hampshire (Κατσαούνης Ν.Κ. – Σπαής Α.Β., 1998)

5. Φυλή Duroc

Η φυλή Duroc δημιουργήθηκε στις Η.Π.Α γύρω στο 1870 και είναι προϊόν διασταύρωσης γεννητόρων της ερυθράς Jersey και της Duroc όπου μέχρι τότε

εκτρέφονταν σε περιορισμένη έκταση. Μετά από πολλές διασταυρώσεις και αυστηρή επιλογή είναι η πολυπληθέστερη φυλή στις Η.Π.Α. Η είσοδος της φυλής αυτής στην Ευρώπη έγινε το 1970 όπου και διαδόθηκε σε πολλές χώρες. Χαρακτηριστικό της φυλής είναι ότι τόσο η ωμοπλάτη όσο και η λεκάνη και οι γλουτοί-μηροί καλύπτονται από αναπτυγμένες μυϊκές μάζες που στα οπίσθια άκρα κατεβαίνουν χαμηλά προς το ακροτάρσιο. Η φυλή είναι γνωστή ως «ο χοίρος με τα τέσσερα χοιρομήρια». Αποδίδει σφάγια πολύ καλής ποιότητας με ποσοστό 70%. Όμως η ποιότητα του σφάγιου δεν ικανοποιεί τους καταναλωτές πάντα λόγω της υψηλής λιποπεριεκτικότητας του. Ο χρωματισμός είναι ομοιόμορφος καστανός ή καστανόξανθος.



Εικόνα 2.5 : Φυλή Duroc (Κατσαούνης Ν.Κ.- Σπαής Α.Β., 1998)

6. Εγχώριος γηγενής ελληνικός χοίρος

Οι κοινωνικό-οικονομικές συνθήκες στη χώρα μας, που επικρατούσαν τη δεκαετία του 1950, καθώς και οι συνήθειες των καταναλωτών, οι από χρόνια διαμορφωμένες, δεν επέτρεψαν τη δημιουργία μιας εγχώριας φυλής χοίρων, σταθεροποιημένης και ικανοποιητικής παραγωγικότητας. Για το λόγο αυτό, δεν μπορούμε να αναφερθούμε σε μια «ελληνική φυλή χοίρων», αλλά σε ένα εγχώριο πληθυσμό, ο οποίος παρουσίαζε μεγάλη παραλλακτικότητα μορφολογικών χαρακτηριστικών και χαμηλή παραγωγικότητα. Η πρώτη περιγραφή του εγχώριου ελληνικού χοίρου πραγματοποιήθηκε από τον Β. Χατζήολο (1941), σύμφωνα με την οποία, ο συγκεκριμένος χοίρος ανήκει στην ομάδα των χοίρων της Μεσογείου και συγγενεύει με αυτούς της Ιταλίας και της Ισπανίας. Πρόκειται για ζώο, που η όλη διάπλαση του σώματος του θυμίζει των αβελτίωντων χοίρων. Το ρύγχος του, είναι μακρύ και ισχυρό. Τα άκρα του, είναι υψηλά και ισχυρά αλλά έχουν περιορισμένη μυϊκή μάζα. Οι χοίροι αποδίδουν σφάγια 60-90kg κατώτερης ποιότητας. Το κρέας, είναι χονδρόινο ερυθρό και στερείται ενδομυϊκής εναπόθεσης λίπους. Αντίθετα, η ποσότητα υποδόριου λιπώδη ιστού είναι υπερβολική. Ο χρωματισμός ποικίλλει από το λευκό ως το μαύρο, ενώ πολλά άτομα είναι φαιά ή έχουν διάφορες κηλίδες. Οι εγχώριοι ελληνικοί χοίροι εκτρέφονταν εκτατικά σε μικρές αγέλες. Τέτοιες αγέλες

συναντούσε κανείς σε δάση βελανιδιάς και καστανιάς. Σήμερα, έπειτα από διάφορες διασταυρώσεις με ξένες φυλές οι εγχώριοι χοίροι έχουν εξαφανιστεί. Όμως, υπάρχουν μεμονωμένες εγχώριες χοιρομητέρες, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να διασταυρωθούν με αγριόχοιρους, με αποτέλεσμα να παράγονται μιγάδες αγριόχοιρων, το σφάγιο των οποίων διοχετεύεται ως «αγριογούρουνο».



Εικόνα 2.6 : Ελληνικός γηγενής χοίρος (Κατσαούνης Ν.Κ. – Σπαής Α.Β., 1998)

7. Ελληνικός μαύρος χοίρος

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (F.A.O 2007), οι ντόπιες φυλές έχουν μεγάλη σημασία για τη διατήρηση της γενετικής ποικιλότητας και των τροφίμων του μέλλοντος. Οι οικόσιτες φυλές, θεωρούνται μέρος της πολιτιστικής κληρονομιάς των τοπικών αλλά και εθνικών κοινοτήτων. Από την αρχαιότητα οι χοίροι ως είδος παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι τους χρησιμοποιούσαν για το κρέας τους και για το λαρδί τους, ώστε να τραφούν οι τοπικοί πληθυσμοί στις ορεινές περιοχές στη λεκάνη της Μεσογείου (Μιχαηλίδου Σ., 2014). Η μαύρη φυλή χοίρων έχει να επιδείξει διασημότητες υψηλής γαστρονομικής αξίας στις μεσογειακές χώρες, οι οποίες έχουν κοινό τον αρχαίο πρόγονο. Η φυλή Nero di Nebrodi της Σικελίας, όπου ταξίδεψε εκεί με Έλληνες αποίκους στην αρχαιότητα, η πασίγνωστη φυλή Patta Negra της Ισπανίας, το Porco Nero, ο μαύρος χοίρος της Κορσικής και η ιταλική Cinta Senese αποτελούν μέρος της διατροφικής πολιτιστικής κληρονομιάς της Μεσογείου. Οι ρίζες της φυλής στον ελλαδικό χώρο φτάνουν τα 9000 χρόνια π.Χ. Ένα παράδειγμα, που επιβεβαιώνει την ύπαρξη της φυλής είναι ο Εύμαιος, ο πιστός χοιροβοσκός του Οδυσσέα που φύλαγε το κοπάδι στα χρόνια του Ομήρου. Ένα άλλο παράδειγμα, είναι η σφαγή μαύρων χοίρων που εκτρέφονταν στη Μακεδονία το 334 π.Χ. από το Μέγα Αλέξανδρο, με σκοπό να θρέψει 50.000 στρατιώτες για την εκστρατεία του στην Ανατολή. Επιπλέον, σύμφωνα με αρχαιολογικά ευρήματα, οστά από οικόσιτο μαύρο χοίρο βρέθηκαν στον οικισμό Σιταργούς της Δράμας (Μιχαηλίδου Σ., 2014). Ο Ελληνικός μαύρος χοίρος, είναι η μοναδική ιθαγενής φυλή

χοίρων που έχει εκτραφεί στην Ελλάδα και που αποτελούσε μέρος της ζωής της ελληνικής αγροτικής οικογένειας από την αρχαιότητα μέχρι τη δεκαετία του 1960. Πρόκειται, για μία φυλή η οποία ήταν σε θέση να προσαρμόζεται σε διαφορετικές και σκληρές περιβαλλοντικές συνθήκες. Όμως, η μετανάστευση στα τέλη του 1960, είχε ως αποτέλεσμα την ερήμωση της ελληνικής υπαίθρου και την αντικατάσταση του μαύρου χοίρου από νέες βελτιωμένες φυλές ξένων χοίρων. Πλέον, ελάχιστα ζώα της φυλής αυτής διατηρούν και εκτρέφουν κάποιοι κτηνοτρόφοι. Με τις εκμεταλλεύσεις τους να έχουν περίπου 300 χοιρομητέρες συνολικά, γεγονός που καθιστά τον ελληνικό χοίρο στο κατάλογο των αυτοχθόνων φυλών που απειλούνται με εξαφάνιση. Οι λίγες αυτές εκτροφές εντοπίζονται στην Ηπειρωτική Ελλάδα και κυρίως στη Βόρεια και Κεντρική Ελλάδα. Όσο αναφορά, τα χαρακτηριστικά του ελληνικού μαύρου χοίρου, μοιάζουν με τα χαρακτηριστικά του μαύρου χοίρου των μεσογειακών χωρών. Έχει μακρύ ρύγχος και σε σχέση με τις άλλες φυλές χοίρων χαμηλό σωματικό βάρος. Οι χοιρομητέρες έχουν εποχική αναπαραγωγική ικανότητα. Γεννούν περίπου 7 χοιρίδια/έτος. Φτάνουν στην αναπαραγωγική πρωιμότητα σχετικά αργά σε ηλικία 8 μηνών με μέσο βάρος 80-90 kg. Το σωματικό βάρος των χοιριδίων στον απογαλακτισμό είναι περίπου 8 kg. Από τα χοιρίδια που γεννιούνται, μονό το 80% θα φτάσει στην ηλικία σφαγής, επειδή υπάρχουν απώλειες που οφείλονται σε εξωτερικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως τα σαρκοφάγα ζώα και οι δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι χοίροι συνήθως σφάζονται σε 240-300 ημέρες και το σφάγιο έχει σωματικό βάρος περίπου 60 kg. Ο μαύρος χοίρος, έχει εξαιρετική ποιότητα κρέατος και προϊόντα κρέατος που έχουν υποστεί επεξεργασία, με οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που καθιστούν το κρέας του μαύρου χοίρου ως μία ξεχωριστή φυλή, σε σχέση με τις άλλες φυλές στην Ελλάδα. Το κρέας του είναι ερυθρό, χονδρόινο και έχει περισσότερο ενδομυϊκό λίπος, κάτι που το καθιστά χυμώδες σε σχέση με τα άλλα χοιρινά κρέατα. Το λίπος του είναι πλούσιο σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (50%) κάτι που το καθιστά εξαιρετική πηγή α-λινολεϊκού οξέος. Γενικά, υπάρχουν λίγες πληροφορίες για το εκτεταμένο σύστημα εκτροφής των χοίρων αυτών. Η υγιεινή, η ποιότητα και η ποσότητα του τελικού προϊόντος ποικίλλει και εξαρτάται από την ηλικία σφαγής και την εποχή του έτους. Υπάρχουν καλές προοπτικές για την επέκταση αυτού του είδους εκτροφής. Οι χοίροι αυτοί είναι πολύ ανθεκτικοί στις παρασιτικές και μικροβιακές λοιμώξεις. (Δεληγιώργης Σ., 2004).



Εικόνα 2.7 : Ελληνικός μαύρος χοίρος

<https://sustainabilityreport.delhaizegroup.com/2013/case-studies/sustainable-private-brands/alfa-beta/>

3.ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ ΚΑΙ ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΡΕΑΤΟΣ

Τα διατροφικά σκάνδαλα που έχουν απασχολήσει το καταναλωτικό κοινό ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, όπως η Σπογγώδεις Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών (Σ.Ε.Β), η γρίπη των πουλερικών καθώς και οι προσμίξεις κρεάτων ή προϊόντων κρέατος, όπως για παράδειγμα με κρέας αλόγου που έχει καταναλώσει το αντιφλεγμονώδες φάρμακο φαινυλοβουταζόνη, οι μη ορθές πρακτικές που εσκεμμένα εφαρμόζονταν από κάποιους παραγωγούς τροφίμων, οι τροφικές αλλεργίες κ.α., είναι γεγονότα που έχουν αυξήσει την ανησυχία των καταναλωτών για τη σύσταση και τη ποιότητα των τροφίμων (επεξεργασμένων και μη). Έτσι, η αναγνώριση και η προέλευση του κρέατος και γενικότερα των τροφίμων ,αντιπροσωπεύει ένα τεράστιο τομέα του σύγχρονου ελέγχου της ποιότητας τροφίμων σύμφωνα με την Ε.Ε. η οποία έχει θεσπίσει μια σειρά από αυστηρές διαδικασίες, όσο αναφορά το τρόπο με τον οποίο περιγράφονται τα συστατικά των τροφίμων στις ετικέτες. Η τακτική για τον έλεγχο της τροφικής αλυσίδας για τη πιστοποίηση της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων, ελέγχεται σε παγκόσμιο επίπεδο, το οποίο αλλάζει συνεχώς όσον αναφορά τους κανόνες και τις απαιτήσεις. Οι ελεγκτικοί μηχανισμοί, που αφορούν τα τρόφιμα, έχουν εξελιχθεί σε κάτι πιο ολοκληρωμένο και περισσότερο προληπτικό. Συνεπώς, η ιχνηλασιμότητα είναι η μέθοδος με την οποία οι καταναλωτές μπορούν να εμπιστευτούν το προϊόν, το οποίο θα αγοράσουν (από τη φάση παραγωγής του μέχρι το ράφι του καταστήματος). Στην Ελλάδα η πρώτη δοκιμή οργάνωσης μηχανισμού ελέγχου στα

τρόφιμα ζωικής προέλευσης, έγινε με το Ν.248/1914 'Περί οργανώσεως της Ζωοτεχνικής και Κτηνιατρικής Υπηρεσίας', όπου από τότε εφαρμόστηκε πλήθος νομοθετημάτων για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης ιδιαίτερα για το κρέας. Με την είσοδο της χώρα στην Ε.Ε., εφαρμόστηκαν νέοι νόμοι σχετικά με τους μηχανισμούς ελέγχου των τροφίμων που ήταν πιο εκτεταμένοι και αφορούσαν όλη τη διαδικασία, από τη παραγωγή μέχρι την κατανάλωση και για όλα τα παραγωγικά ζώα δηλαδή, βοοειδή, χοιρινά και αιγοπρόβατα. Αφορά λοιπόν, τις συνθήκες εκτροφής των ζώων (διατροφής – διαβίωσης στο σταύλο) καθώς, και τη μετακίνηση τους στο σφαγείο, την αναισθητοποίηση, τη σφαγή, τη μεταφορά του κρέατος στα σημεία πώλησης και η συντήρηση του μέχρι να φτάσει στο πιάτο του καταναλωτή. Η προέλευση και η ταυτότητα των ζώων συνδέεται άρρηκτα με την ιχνηλασιμότητα και αποτελεί έναν τρόπο για τον έλεγχο των νόσων των ζώων. Συμπερασματικά, είναι απόλυτα κατανοητή η σχέση ιχνηλασιμότητας, επισήμανσης και ταυτοποίησης των τροφίμων και για το λόγο αυτό θα αναφερθούμε στο καθένα ξεχωριστά παρακάτω.

3.1 ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (Οδ.2000/13/Ε.Κ) με τον όρο επισήμανση τροφίμων εννοούμε τις μνείες, τις ενδείξεις, τα εμπορικά ή βιομηχανικά σήματα, εικόνες ή σύμβολα που αναφέρονται σε ένα τρόφιμο και φέρονται σε κάθε συσκευασία, πινακίδα ή ετικέτα που συνοδεύουν ή αναφέρονται στο τρόφιμο. Οι βασικές αρχές που διέπουν τη σήμανση των τροφίμων είναι ότι :

1) Δεν πρέπει να είναι παραπλανητικές προς τους καταναλωτές ιδιαίτερα :

- Όσον αναφορά τις ιδιότητες των τροφίμων, τη σύσταση, τη ταυτότητα, τη προέλευση και το τρόπο παρασκευής.
- Όσο αναφορά την απόδοση αποτελεσμάτων για το τρόφιμο που δεν έχει.
- Να υπονοεί ότι το τρόφιμο έχει κάποια χαρακτηριστικά που το κάνουν ιδιαίτερο ενώ στη πραγματικότητα τα χαρακτηριστικά του είναι όμοια με άλλα παρόμοια τρόφιμα.

2) Να δίνει σε ένα τρόφιμο ιδιότητες θεραπείας, πρόληψης και αγωγής οποιασδήποτε ανθρώπινης ασθένειας.

Η ενημέρωση των καταναλωτών για ένα τυποποιημένο τρόφιμο, γίνεται σε αναγραφόμενη ετικέτα στην επιφάνεια των προϊόντων, που μας δίνει πληροφορίες για τα συστατικά του, τη προέλευσή του και την ημερομηνία παραγωγής και λήξης του. Στη περίπτωση μη συσκευασμένων τροφίμων οι πληροφορίες αυτές μπορούν να αναγράφονται σε πινακίδα τοποθετημένη κοντά στο τρόφιμο. Η επισήμανση όλων των νωπών κρεάτων περιλαμβάνει ένα καρτελάκι, στο οποίο αναγράφεται ο αριθμός της Κτηνιατρικής Υπηρεσίας για την έγκριση της σφαγής του ζώου, στο χώρο όπου πραγματοποιήθηκε η σφαγή ή και ο τεμαχισμός. Το σήμα αναγνώρισής, είναι σφραγίδα ωειδούς σχήματος.

3.2 ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑ

Η δυνατότητα να γνωρίζουμε την προέλευση και προέλευση κάθε υλικού που χρησιμοποιούμε, σε ποιο προϊόν χρησιμοποιήθηκε και που έχει διατεθεί το συγκεκριμένο προϊόν, αποτελεί μια από τις βασικές αρχές των Συστημάτων Διασφάλισης Ποιότητας. Τα διάφορα διατροφικά σκάνδαλα που τα τελευταία χρόνια έχουν καταρρίψει την εμπιστοσύνη των καταναλωτών, έγινε αντιληπτό ότι τα υπάρχοντα συστήματα ελέγχου δεν επαρκούν για να εξασφαλίσουν την ασφάλεια και ποιότητα των προϊόντων. Σύμφωνα με την πρόσφατη παγκόσμια συμφωνία στη CODEX ALIMENTARIUS (2004), η ικανότητα παρακολούθησης της διακίνησης ενός τρόφιμου κατά τις φάσεις παραγωγής και επεξεργασίας και διανομής, αποτελεί τον όρο της ιχνηλασιμότητας. Είναι δηλαδή, ένα ολοκληρωμένο σύστημα ταυτοποίησης, σκοπός του οποίου, είναι κάθε προϊόν να διαθέτει μια ανταγωνιστική ταυτότητα σε όλα τα στάδια της αλυσίδας. Η ταυτότητα αυτή, έχει την όψη ενός κωδικού στην επιφάνεια του προϊόντος, καθώς και ενός αρχείου που το συνοδεύει με πληροφορίες που αφορούν την προέλευση και τα συστατικά του τόσο στα προηγούμενα και επόμενα στάδια της αλυσίδας (διαδοχική ιχνηλασιμότητα), όσο και στο τρέχον στάδιο (εσωτερική ιχνηλασιμότητα). Το Σύστημα Ιχνηλασιμότητας παρέχει στοιχεία για τους δύο βασικούς τύπους ιχνηλασιμότητας :

- Προς τα εμπρός (Downstream) Ιχνηλασιμότητα: αρχίζοντας από μία συγκεκριμένη παρτίδα πρώτης ύλης, καταλήγουμε στον εντοπισμό όλων των παρτίδων τελικών προϊόντων που παρήχθησαν.

- Προς τα πίσω (Upstream) Ιχνηλασιμότητα : γνωρίζοντας την παρτίδα του τελικού προϊόντος, να ερευνήσουμε τις Α' ύλες που χρησιμοποιήθηκαν για τη παραγωγή της.

Ένα Σύστημα Ιχνηλασιμότητας αποτελείται από τρία υποσυστήματα:

- Σύστημα Διαδοχικής Ιχνηλασιμότητας -1
- Σύστημα Εσωτερικής Ιχνηλασιμότητας
- Σύστημα Διαδοχικής Ιχνηλασιμότητας +1 (ISO 22005,2007)

Στις πληροφορίες, θα πρέπει να αναφέρονται υποχρεωτικά: α) Η επωνυμία και η διεύθυνση του προμηθευτή, β) το είδος των προϊόντων που διακινήθηκαν καθώς και γ) την ημερομηνία που εμπορεύτηκαν. Προτείνεται επίσης, να κρατούνται πληροφορίες που αφορούν τη ποσότητα και τους αριθμούς των παρτίδων των προϊόντων. Η περίοδος που θα πρέπει να κρατούνται οι πληροφορίες αυτές, προσδιορίστηκε στα 5 χρόνια, εξαιρώντας τα προϊόντα που έχουν περισσότερο από 5 χρόνια ζωής (κρατούνται ίσο με το χρόνο ζωής και 6 μήνες ακόμα) ή τα προϊόντα που έχουν λιγότερο από 3 μήνες ζωή ή δεν αναφέρεται συγκεκριμένη ημερομηνία λήξης (η περίοδος που κρατούνται είναι έως και 6 μήνες μετά την ημερομηνία παραγωγής).

Η ιχνηλασιμότητα έχει ως στόχο :

- Να αποτρέψει την εφαρμογή δόλιων πρακτικών ή οποιονδήποτε άλλων πρακτικών που αποσκοπούν στην παραπλάνηση ή την εξαπάτηση των καταναλωτών.
- Να αποτρέψει την νόθευση των τροφίμων.
- Να εξασφαλίσει την ασφάλεια των τροφίμων.
- Να έχει την δυνατότητα να εξαλείψει από την αγορά ένα επικίνδυνο τρόφιμο.
- Να εφαρμόζονται οι υγιείς κανόνες εμπορίου, η διαφάνεια και η αξιοπιστία της πληροφορίας που εκπέμπει στον καταναλωτή. (Οδηγία 2000/13/ΕΚ)

3.3 ΑΥΘΕΝΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΡΕΑΤΟΣ

Η αυθεντικότητα των τροφίμων, μέσα από την πλευρά της γνησιότητας, της προέλευσης και των ακατάλληλων χαρακτηριστικών, βρίσκονται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος, πιθανότατα από τη στιγμή που τα τρόφιμα ξεκίνησαν να πωλούνται. (Αρβανιτόγιαννης, 2005). Οι καταναλωτές ζητούν σωστή και ακριβή ενημέρωση, ώστε να κάνουν σωστές επιλογές στα προϊόντα που αγοράζουν. Συνεπώς, η ταυτοποίηση του κρέατος και των προϊόντων του είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας στην εκτίμηση της σύστασης των τροφίμων και στη παροχή ορθών πληροφοριών προς τους καταναλωτές (Woolfe and Primrose 2004, 2010, 2012). Στις μέρες μας, η αυθεντικότητα των τροφίμων και ιδιαίτερα των κρεάτων, είναι θέμα μεγάλης σημασίας, λόγω του ότι αυξήθηκε ο αριθμός των περιπτώσεων νόθευσης. Παρά την αυστηρή νομοθεσία που επέβαλε η Ευρωπαϊκή Ένωση το 2005 για τα συστήματα ελέγχου, για να εγγυηθεί την ιχνηλασιμότητα του κρέατος, παρατηρήθηκε ότι οι μέθοδοι ιχνηλασιμότητας, που βασίζονται μόνο σε κωδικούς παρτίδας ή οποιαδήποτε άλλα έγγραφα και αρχεία καταγραφής, δεν είναι απόλυτα αξιόπιστα και έγκυρα, διότι πάντα υπάρχει η περίπτωση να είναι πλαστογραφημένα (Roja, 2009). Η ταυτοποίηση των ειδών είναι το κύριο στοιχείο για τον έλεγχο της ταυτότητας των τροφίμων και την εξάλειψη των παραπλανητικών πρακτικών. Αυτό ισχύει περισσότερο για τα προϊόντα κρέατος, λόγω του μεγάλου αριθμού που μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως Α' ύλη αλλά και λόγω των διαφορετικών επεξεργασιών, που εφαρμόζονται μέχρι τη τελική πώληση, καθώς και των μεγάλων διαφορών στη διατροφική αξία και στη κοστολόγηση. Όμως, το μαγείρεμα, το κάπνισμα, το τηγάνισμα, το αλάτισμα ή η κονσερβοποίηση, καθώς και άλλες εξεργασίες δημιουργούν προβλήματα στη ταυτοποίηση, λόγω της αλλοίωσης των βασικών χαρακτηριστικών του κρέατος. Ωστόσο, οι νομοθετικά απαιτούμενες επισημάνσεις στις ετικέτες των προϊόντων, η ανάγκη του να γνωρίζουμε τη διατροφική αξία των προϊόντων (συστατικά που δεν επιτρέπονται από το νόμο, αναγραφή συστατικών που δεν περιέχονται κ.λπ.) καθώς και για αποφυγή των επικίνδυνων οργανισμών με κατάλοιπα τοξινών, καθιστούν υποχρεωτικό τον ακριβή προσδιορισμό της αυθεντικότητας των επεξεργασμένων τροφίμων. Επιπλέον, ανάμεσα στο καταναλωτικό κοινό, που επιλέγει το κρέας που θα καταναλώσει με βάση ορισμένων κριτηρίων (όπως η τιμή, το βιολογικό επίπεδο, τις διατροφικές ανάγκες προτιμήσεις κ.λπ.), υπάρχουν και ορισμένες ομάδες καταναλωτών όπως οι χορτοφάγοι, που απαιτούν έλλειψη του κρέατος και των προϊόντων του, οι καταναλωτές που λόγω κάποιας αλλεργίας ή για άλλους λόγους υγείας δεν καταναλώνουν κάποιο είδος κρέατος, οι καταναλωτές που επιθυμούν βιολογικό κρέας και καταναλωτές που λόγω των θρησκευτικών τους πεποιθήσεων δεν επιτρέπεται να καταναλώνουν κάποια είδη κρέατος όπως οι μουσουλμάνοι το χοιρινό. Οι μουσουλμάνοι για την αποφυγή θεμάτων νοθείας, καταναλώνουν μόνο

είδη «halal», που σημαίνει το επιτρεπόμενο, το κατάλληλο. Η ταυτοποίηση του κρέατος έχει μεγάλη σημασία αν σκεφτεί κανείς ότι καθημερινά τεράστιες ποσότητες κρέατος διακινούνται σε όλο τον κόσμο, καθώς και το συνολικό τζίρο που υπάρχει γύρω από αυτά τα προϊόντα. Συνεπώς, οι επιχειρήσεις που νοθεύουν τα προϊόντα κρέατος, με άλλα είδη κρέατος χαμηλότερης διατροφικής και οικονομικής αξίας έχουν μεγάλο οικονομικό όφελος. Η αναγνώριση της γνησιότητας των ζωικών ειδών, είναι μια καθοριστικής σημασίας διαδικασία, λόγω του υψηλού αριθμού περιπτώσεων νοθείας. Έτσι, για την αποφυγή τέτοιων προβλημάτων νοθείας απαιτείται η ορθή επισήμανση των τροφίμων. Γενικά, ως νοθεία ορίζεται η προσθήκη ουσιών που δεν επιτρέπεται η χρήση τους στα τρόφιμα, καθώς και η προσθήκη ουσιών που επιτρέπονται. Η νοθεία διακρίνεται σε δύο είδη: α) στη νοθεία που είναι επικίνδυνη για την υγεία και β) στη νοθεία που είναι μεν ακίνδυνη για την υγεία, αλλά ζημιώνει οικονομικά τον καταναλωτή. Ως μη νοθευμένο, ορίζεται ένα τρόφιμο, η σύσταση του οποίου αναγράφεται στη συσκευασία και ταυτίζεται με τη σύνθεση του (Hargin , 1996). Για την εφαρμογή των κανόνων του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών απαιτείται αυστηρός έλεγχος. Η νοθεία του κρέατος και προϊόντων κρέατος έχει πολλά είδη νοθείας. Ο Hargin (1996) διαχωρίζει τα θέματα αυθεντικότητας που αφορούν το κρέας και τα προϊόντα του σε τέσσερις κατηγορίες:

- Τη προέλευση, δηλαδή, το φύλο, τη φυλή, τη διατροφή, την ηλικία σφαγής, τη γεωγραφική προέλευση, το είδος εκτροφής (άγρια και εκτρεφόμενα) και το είδος κρέατος (συμβατικό και βιολογικό).
- Τη σύσταση, δηλαδή, το είδος του κρέατος, το λίπος, τη πρωτεΐνη και άλλες ουσίες που έχουν στόχο την παραπλάνηση του καταναλωτή.
- Την επεξεργασία, δηλαδή, τα προϊόντα τα οποία είναι κατεψυγμένα ενώ πωλούνται ως φρέσκα και ακτινοβολημένα τα οποία πωλούνται ως μη ακτινοβολημένα.
- Και διάφορα πρόσθετα, όπως τεχνητές χρωστικές που χρησιμοποιούνται ως φυσικές, διάφορα συντηρητικά, πρόσθετα γεύσης, γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί κ.λπ..

Η διάδοση της νοθείας σε κρέας, σαν φαινόμενο σήμερα, είναι δύσκολο να προσδιοριστεί με ακρίβεια. Όμως στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλά παραδείγματα για κρέατα και προϊόντα κρέατος, που έχουν λάθος επισήμανση. Το κατά πόσο λοιπόν το κρέας και γενικά ένα προϊόν είναι γνήσιο ή όχι, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες και είναι πολύ δύσκολο, γιατί υπάρχει πάντα ο ανθρώπινος παράγοντας που στοχεύει στο χρηματικό κέρδος. Για το λόγο αυτό, είναι

απαραίτητη η ανάπτυξη ικανοποιητικών μεθόδων για τον έλεγχο της αυθεντικότητας με όσο είναι δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια, που θα αποσκοπούν στη διάκριση ενός είδους από άλλο.

4. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Η ανησυχία των καταναλωτών σχετικά με το ζήτημα που υπάρχει στο χώρο των τροφίμων, έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας σειράς ελέγχων, που έχουν ως στόχο να πιστοποιήσουν την αυθεντικότητα και να εκθέσουν τη νοθεία και την παραπλάνηση των καταναλωτών. Η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από τη φύση του προϊόντος. Οι παράγοντες που θα καθορίσουν ποια μέθοδος θα χρησιμοποιηθεί εξαρτώνται από, εάν το προϊόν αποτελείται από ολόκληρα τμήματα, αν εξετάζεται ωμό ή έχει υποστεί θερμική επεξεργασία και τέλος εξετάζεται αν το προϊόν περιέχει συστατικά τα οποία δεν αναγράφονται στην ετικέτα. Έτσι, μέθοδοι που είχαν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την ταυτοποίηση των προϊόντων, όπως η οργανοληπτική εξέταση (γεύση, οσμή, χρώμα), οι ανατομικές διαφορές, οι φυσικές ιδιότητες του λιπώδους ιστού, καθώς και τα επίπεδα γλυκογόνου στο μυϊκό ιστό, σήμερα δίνουν τη θέση τους σε μοριακές τεχνικές ανάλυσης (μοριακοί δείκτες), όπως το προφίλ ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών, ανοσολογικές μέθοδοι (ELISA) και τεχνικές υβριδισμού του DNA. Η χρήση μοριακών δεικτών είναι ευρέως διαδεδομένη σε διάφορους κλάδους της επιστήμης και οι μέθοδοι ανάλυσης των γενετικών δεδομένων βελτιώνονται ταχύτατα. Η εξέλιξη των μεθόδων μοριακής ανάλυσης, είχε σαν αποτέλεσμα να προκύψουν δείκτες για την ανάλυση της παραλλακτικότητας σε επίπεδο DNA. Συνεπώς, εντοπίστηκαν διαφορές, τόσο μεταξύ ολόκληρων τμημάτων DNA, όσο και μεταξύ αλληλουχιών νουκλεοτιδίων σε μια συγκεκριμένη περιοχή. Οι μοριακοί δείκτες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες στους: DNA και τους πρωτεϊνικούς δείκτες. Οι DNA δηλαδή, οι γενετικοί δείκτες αφορούν το μιτοχονδριακό και το χλωροπλαστικό DNA. Οι μοριακοί δείκτες, διαθέτουν όλα τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός γενετικού δείκτη: διακρίνουν ποιοτικές διαφορές, διακρίνουν διαφορές στις αλληλουχίες των γονιδίων και στις περιοχές του γενώματος, αντικατοπτρίζουν την ποικιλότητα στο γενετικό υλικό και τέλος δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον. Οι μοριακοί δείκτες πρέπει να έχουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- Την παρουσία πολυμορφισμού
- Υψηλό συντελεστή κληρονομικότητας
- Απλή κληρονομικότητα

- Εξάπλωση σε όλο το γονιδίωμα
- Ανεξαρτησία της βιωσιμότητας
- Σταθερός φαινότυπος κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες
- Χαμηλό κόστος

Οι μοριακοί δείκτες προσδιορίζονται από δύο τμήματα : την περιοχή του DNA που θα «καλύψουν», το επίπεδο πολυμορφισμού και το ποσοστό ετεροζυγωτίας που εμφανίζεται σ' αυτή, καθώς και τη τεχνική που εφαρμόζεται για την εύρεση της διαφοροποίησης. Ο μοριακός δείκτης που θα επιλεγεί για να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση και ταυτοποίηση κάποιου είδους, εξαρτάται από το κόστος της μεθόδου και από τη προοπτική που έχει η κάθε μέθοδος να διαχωρίζει και τα προϊόντα που έχουν υποστεί επεξεργασία (π.χ. θερμική επεξεργασία).

Οι μοριακοί δείκτες διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες :

- Στους δείκτες που δεν βασίζονται στη PCR(RFLPs)
- Στους δείκτες που βασίζονται στη PCR (RAPDs, SSRs, SNPs, SSCP)

Υπάρχουν και δείκτες που ανήκουν και στις δύο κατηγορίες(PCR-RFLP, AFLPs)

Οι τύποι μοριακών δεικτών που χρησιμοποιούσαν συνήθως οι επιστήμονες στο παρελθόν είναι :

- Ο πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικού θραύσματος(RFLP)

Οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Bostein, 1980). Αφορά ένα μοριακό δείκτη, ο οποίος βασίζεται στη δημιουργία διαφορετικού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων μετά από πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα(Williams.,1990).

- Ο πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης(SSCP)

Τα SSCPs αποτελούν τμήματα DNA (200-800 bp) που εντείνονται μέσω της PCR με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών μεγέθους 20-25 bp. Για τον εντοπισμό της παραλλακτικότητας στις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων, γίνεται χρήση πηκτών ηλεκτροφόρησης μονόκλωνου DNA.

- Ο τυχαίος πολλαπλασιασμός πολυμορφικού DNA (RAPD)

Ο όρος RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), μεταφράζεται ως Τυχαία Πολλαπλασιασμένο Πολυμορφικό DNA. Στην μέθοδο RAPD-PCR χρησιμοποιείται ένα ρυθμιστικό διάλυμα, τα νουκλεοτίδια, η Taq πολυμεράση, μικρή ποσότητα DNA και ένας εκκινητής μήκους 10, τυχαίας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων με μια αναλογία βάσεων GC τουλάχιστον 50%. Το μίγμα αυτό τοποθετείται στον θερμοκυκλοποιητή και υπόκειται σε ένα κύκλο μετουσίωσης, υβριδισμού και επέκτασης των αφετηριών. Για να γίνει η επικόλληση του εκκινητή σε πολλά σημεία του γενωμικού DNA θα πρέπει η θερμοκρασία να είναι 36-37°C θερμοκρασία μικρότερη από αυτή της κλασικής PCR. Ακολουθεί ο διαχωρισμός των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και μετά βαφή τους με βρωμιούχο αιθίδιο.

- Ο πολυμορφισμός μήκους πολλαπλασιασμένων τμημάτων (AFLP)

Το AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) είναι μια τεχνική που βασίζεται στον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA που προκύπτουν από τον περιορισμό του γενωμικού DNA με ένα περιοριστικό ένζυμο και στο διαχωρισμό των τμημάτων σε πηκτή ακρυλαμίδιου και χρώση ασημιού ή Ραδιενέργειας (Vos, 1995).

- Μικροδορυφόροι (microsatellites), SSR (Simple Sequence Repeats)

Η μέθοδος αυτή αφορά επαναλαμβανόμενες ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, διάσπαρτες στο γονιδίωμα και που είναι διαφορετικές μεταξύ των ατόμων. Αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA οι οποίες έχουν μήκος 2-5 βάσεων και ο πολυμορφισμός προκύπτει από διαφορές στον αριθμό των επαναλήψεων.

- Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Αφορά ένα σύστημα μοριακών δεικτών που βασίζεται στην υπάρχουσα ποικιλότητα πρωτεϊνών που εκτελούν ταυτόσημη λειτουργία αλλά διαφέρουν ως προς την ηλεκτροφορητική κινητικότητα, λόγω των διαφορών που παρουσιάζουν στην αμινοξική αλληλουχία. (Αλαχιώτης, 2005).

Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μεθόδων:

Η τεχνική RFLP πλεονεκτεί έναντι της κλασικής μεθόδου, επειδή χρειάζεται μικρή ποσότητα DNA, είναι εύκολη, οικονομική και ακίνδυνη γιατί δεν χρησιμοποιείται ραδιενέργεια. Η τεχνική RFLP μειονεκτεί, στο ότι είναι απαραίτητη η γνώση της αλληλουχίας βάσεων σε κάποιο τμήμα για το σχεδιασμό εκκινητών.

Μεγάλο πλεονέκτημα της τεχνικής SSCP είναι η δυνατότητα της να ανιχνεύει ακόμα και μικρές διαφορές στην αλληλουχία του DNA ταυτόχρονα σε πολλά PCR προϊόντα. Έτσι, μπορεί να ελαττώσει στο ελάχιστο την ανάγκη προσδιορισμού της αλληλουχίας των βάσεων του DNA. Είναι μια τεχνική γρήγορη και οικονομική, σχετικά απλή και παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία. (Mitterski, 2000).

Η τεχνική RAPD πλεονεκτεί στο ότι με τη χρήση κάθε τυχαίου εκκινητή προκύπτουν πολυάριθμες γονιδιακές θέσεις, απαιτούνται ελάχιστες ποσότητες DNA, και έχει μικρό κόστος. Βασικό μειονέκτημα της τεχνικής αυτής, είναι η μεγάλη της ευαισθησία που απαιτεί προσεκτικούς χειρισμούς για να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία και η επαναληψιμότητα.

Η τεχνική AFLP παρουσιάζει τα ίδια πλεονεκτήματα με την RAPD και ακόμη είναι πιο αξιόπιστη και προκύπτουν περισσότεροι δείκτες σε σχέση με τη RAPD. Η AFLP όμως παρουσιάζει και τα ίδια μειονεκτήματα με τη RAPD, εμφανίζουν σχέση κυριαρχίας στη κληρονομικότητα και η μέθοδος αυτή είναι πιο ακριβή και επικίνδυνη όταν χρησιμοποιείται ραδιενέργεια.

Μεγάλο πλεονέκτημα στη χρήση μικροδορυφόρων (SSR) είναι η απλή εφαρμογή, η συγκυριαρχία στη κληρονόμηση και η παρουσία μεγάλου πολυμορφισμού. Μειονέκτημα των δεικτών αυτών, είναι η εκτεταμένη έρευνα που απαιτείται για την εφαρμογή τους σε ένα νέο είδος (Zietkiewicz, 1994).

Οι τεχνικές αυτές εφαρμόστηκαν στις φυλογενετικές μελέτες και όχι μόνο, λόγω του ότι ήταν σχετικά οικονομικές και γρήγορες σε σχέση με την αλληλούχηση του DNA. Στη πορεία όμως, η αλληλουχία του γενετικού υλικού άρχισε να κερδίζει έδαφος, λόγω του ότι τόσο ο χρόνος όσο και το κόστος μειώθηκαν. Πρόκειται για μια ακριβή και πολύ αναλυτική τεχνική, που μπορεί να εκτιμήσει τις γενετικές αποστάσεις γονιδιακών τμημάτων ή γονιδίων των οργανισμών που μελετώνται.

4.1 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA/16S rRNA

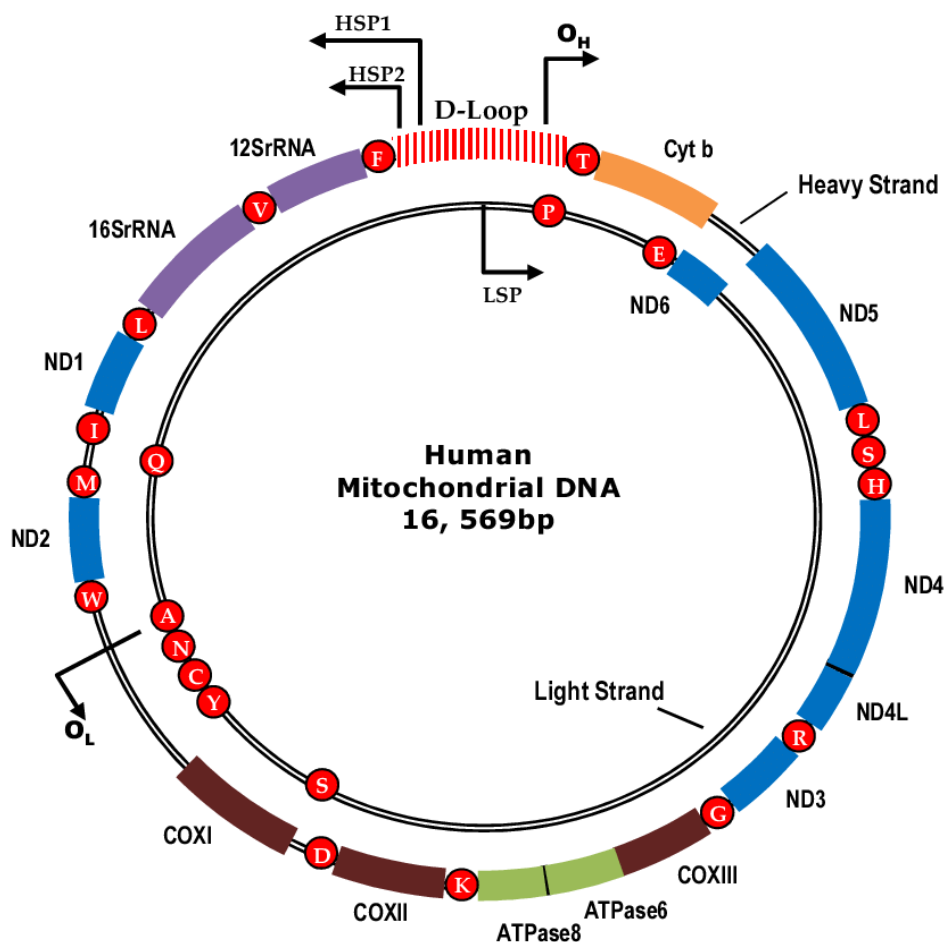
Τα μιτοχόνδρια είναι θεμελιώδη οργανίδια, που βρίσκονται σε όλα τα ευκαριωτικά κύτταρα και χρησιμοποιούνται για το μεταβολισμό των βιολογικών μακρομορίων, που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί με τις τροφές. Με την βοήθεια των μιτοχονδρίων τα κύτταρα διασπούν τους υδατάνθρακες και τα λίπη συνθέτοντας χημική ενέργεια - μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) – μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Διαμαντίδης, 1994). Το mt DNA είναι ένα μικρό πλασμίδιο μικρότερο από 20kb στα περισσότερα θηλαστικά και βρίσκεται μόνο στα μιτοχόνδρια. Το mt DNA είναι ιδιαίτερα πολυμορφικό μέσα στα είδη και

εξελίσσεται πολύ γρήγορα σε σχέση με το πυρηνικό DNA και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται σε μελέτες γενετικής ποικιλότητας και φυλογενετικής δομής σε ένα είδος (Bruford, 2003). Έχει προσδιοριστεί η αλληλουχία περίπου 200 μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων, από τα οποία τα περισσότερα κωδικοποιούν από 3-37 πρωτεΐνες. Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα των ζώων, αποτελούνται από ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA και έχουν κατά κανόνα μόνο 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μαζί με 22 t RNA και 2 r RNA (Stryer, 1997). Το mt DNA ενδείκνυται για χρήση σε μελέτες διαχωρισμού ειδών για τους παρακάτω λόγους :

- Η ποσότητα του ανά κύτταρο είναι επαρκής, αφού απαντάται περίπου σε 1000 αντίτυπα (1000 φορές περισσότερο από το πυρηνικό DNA). Αυτό αυξάνει τη πιθανότητα επιτυχούς ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος του γονιδιώματος που μας ενδιαφέρει με τη τεχνική της PCR.
- Λόγω της μητρικής του προελεύσεως και την απουσία ανασυνδυασμού κληρονομείται από γενιά σε γενιά.
- Η συσσώρευση πολυμορφισμών και η δημιουργία μεγάλης ποικιλομορφίας μεταξύ των μιτοχονδρίων, όχι μόνο μεταξύ των ειδών αλλά και στο ίδιο είδος, οφείλεται στο μεγάλο αριθμό μεταλλαγής του (10 φορές μεγαλύτερος από το πυρηνικό).

Τα γονίδια του mt DNA με προτίμηση σε μελέτες διαχωρισμού ειδών είναι τα: 16S και 12S r RNA, Cyt b και το D-Loop. Η επιλογή αυτών των γονιδίων στηρίζεται στο ότι ο ρυθμός και ο τρόπος εξέλιξης τους είναι κατανοητός, σχετικά σταθερός και όμοιος μεταξύ μεγαλόσωμων χερσαίων ειδών. Το 16S rRNA αποτελεί συστατικό των προκαρυωτικών ριβοσωμάτων. Πολλαπλές ακολουθίες 16S rRNA μπορούν να υπάρχουν σε ένα μοναδικό βακτήριο. Το 16S rRNA είναι κατάλληλο για χαρακτηρισμό διαφόρων ειδών διότι: έχει συντηρημένες αλληλουχίες ανάμεσα στα είδη που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σχεδιασμό γενικών εκκινητών για PCR, έχει μεταβλητές αλληλουχίες, που παρέχουν τον πολυμορφισμό για χαρακτηρισμό σε επίπεδο είδους ή στελέχους (Μαρκουλάτος, 2009). Το mt DNA είναι κατάλληλο εργαλείο σε μελέτες ταυτοποίησης των ειδών για τους εξής λόγους:

- Ο υψηλός ρυθμός μεταλλαγής, έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση πολυμορφισμών και τη δημιουργία ποικιλομορφίας μεταξύ των ειδών αλλά και στο ίδιο είδος (Clayton, 1984).
- Σε κάθε κύτταρο μπορεί να υπάρχει μεγάλος αριθμός μιτοχονδρίων που φτάνει μέχρι και τα 1000 αντίγραφα. Έτσι, με τη τεχνική της PCR αυξάνεται η πιθανότητα επιτυχούς ενίσχυσης (Scheffler, 2001).



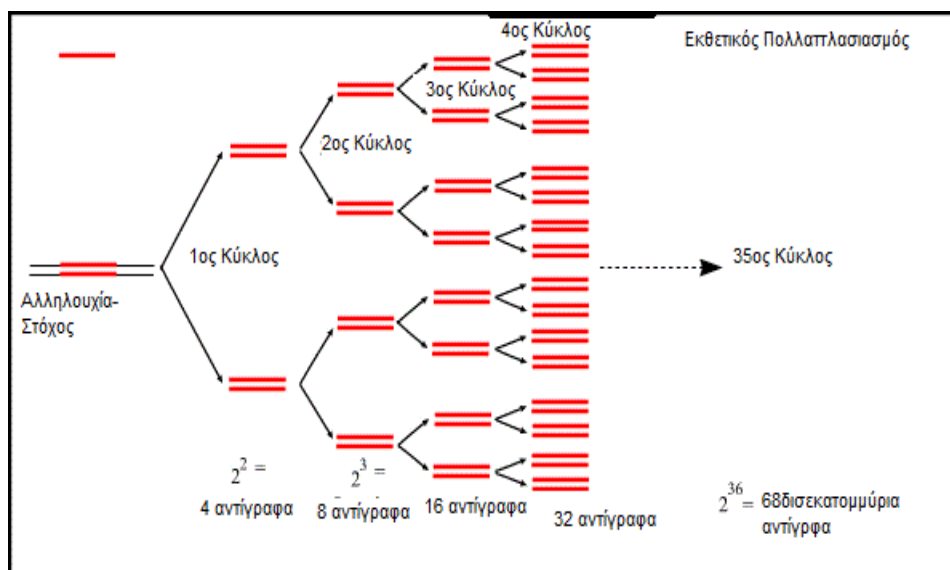
Εικόνα 4.1.1 : Τα γονίδια του μιτοχονδριακού γονιδιώματος καθώς και η θέση τους στο γονιδίωμα.

https://www.researchgate.net/figure/The-human-mitochondrial-genome_fig3_312069102

4.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase chain reaction, PCR)

Τα τελευταία 20 χρόνια, έχουν αναπτυχθεί μοριακοί δείκτες που βασίζονται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής

αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Η μέθοδος PCR βασίζεται στη κινητική επανασύνδεση αποδιαταγμένου δίκλωνου DNA, ιδιαίτερα στην αρχή, όπου η διάρκεια επανασύνδεσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση και τη πολυπλοκότητα των συμπληρωματικών αλυσίδων και αποτελεί τη βάση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Είναι μία μέθοδος, που αναπτύχθηκε το 1985 από τον Mullis και άρχισε να εφαρμόζεται ευρέως από το 1987 με τη χρήση θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών. Η PCR στηρίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οριοθετείται δεξιά και αριστερά από δύο εκκινητές - ολιγονουκλεοτίδια (primers). Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA –εκμαγείου και χρησιμοποιείται για τη δημιουργία δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της μιας αλυσίδας του DNA και ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της άλλης αλυσίδας του DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά 20-30 βάσεων χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικά τμήματα (εκκινητές) για in vitro σύνθεση DNA και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος. Αυτό το τμήμα, θα επιλεγεί και θα πολλαπλασιαστεί πολλές φορές με τη συνεργασία άλλων μορίων. Συγκεκριμένα, μια Taq DNA πολυμεράση, η οποία βάση ενός προτύπου δίκλωνου DNA και παρουσία κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος και ενός ζεύγους ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών, των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs : d ATP, d CTP , d GTP, d TTP), ιόντων Μαγνησίου (Mg⁺⁺) συνθέτει εκατομμύρια νέα πιστά αντίγραφα μόρια DNA , ως προς εκείνο το τμήμα της ακολουθίας του αρχικού εκμαγείου, το οποίο περικλείεται ανάμεσα στους DNA εκκινητές. (Berg, 2002). Οι εκκινητές καθορίζουν τα όρια της περιοχής που θα ενισχυθεί. Το ρυθμιστικό διάλυμα ορίζει το ιοντικό περιβάλλον (κυρίως το pH) της αντίδρασης στο βέλτιστο για τη δράση της πολυμεράσης. Τα ιόντα μαγνησίου συμμετέχουν στη διαδικασία υβριδισμού των εκκινητών. Τα δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) συνιστούν τα δομικά υλικά των μορίων DNA που θα συντεθούν, επιπλέον προσφέρουν και την απαραίτητη ενέργεια για την επιμήκυνση. Η αντίδραση σχηματισμού των νέων μορίων καταλύεται από το ένζυμο πολυμεράση. Η Taq πολυμεράση έχει απομονωθεί από το θερμοφίλο βακτήριο, *Thermus aquaticus*, και είναι θερμοσταθερή διατηρώντας τη δραστηριότητα της σε θερμοκρασίες 95° C για τουλάχιστον 40 λεπτά (Mullis 1987).



Εικόνα 4.2.1 : Εκθετικός πολλαπλασιασμός του DNA – στόχου

Υπάρχουν και ορισμένοι παράμετροι που παίζουν σημαντικό ρόλο στην Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) και είναι οι ακόλουθοι:

- Η συγκέντρωση των εκκινητών, πρέπει να είναι αρκετά υψηλή, ώστε η σύνδεσή τους με την αντίστοιχη μονόκλωνη αλυσίδα να γίνεται ταχύτατα και κατά την εξέλιξη της αντίδρασης η σύνδεση αυτή να γίνεται πιο γρήγορα από την επανασύνδεση εκμαγείου-εκμαγείου.
- Η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας και χρόνου σε κάθε στάδιο της αντίδρασης βοηθά την εξειδίκευση της αντίδρασης.
- Η εξειδίκευση και η απόδοση της μεθόδου αυξήθηκε με τη χρήση της Taq πολυμεράσης, λόγω του ότι χρησιμοποιούνται υψηλότερες θερμοκρασίες στα στάδια σύνδεσης και επιμήκυνσης.

Επιπλέον, για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση, το μίγμα αντιδραστηρίων μαζί με τη ποσότητα του ολικού DNA, μεταφέρεται σε θερμοκυκλοποιητές. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε κύκλους (συνήθως 30-35). Ο κάθε κύκλος έχει ως αποτέλεσμα τον εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA-στόχου. Συνεπώς, ο DNA-στόχος, από αρχική ποσότητα δείγματος μη ανιχνεύσιμου με κλασικές τεχνικές υβριδισμού, ενισχύεται σε βαθμό που να γίνει ευρέως ανιχνεύσιμος. (Williams,1990).

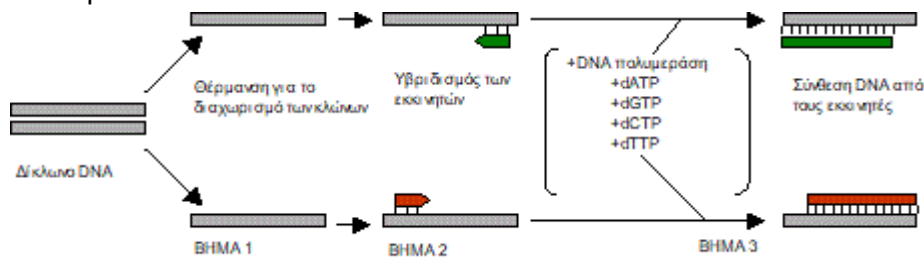
Η μέθοδος της PCR επιτυγχάνεται σε 3 στάδια:

- **Το στάδιο αποδιάταξης** (denaturation): στο στάδιο αυτό, το μίγμα θερμαίνεται στους 94°C για ορισμένο χρόνο (περίπου ένα με δύο λεπτά) με

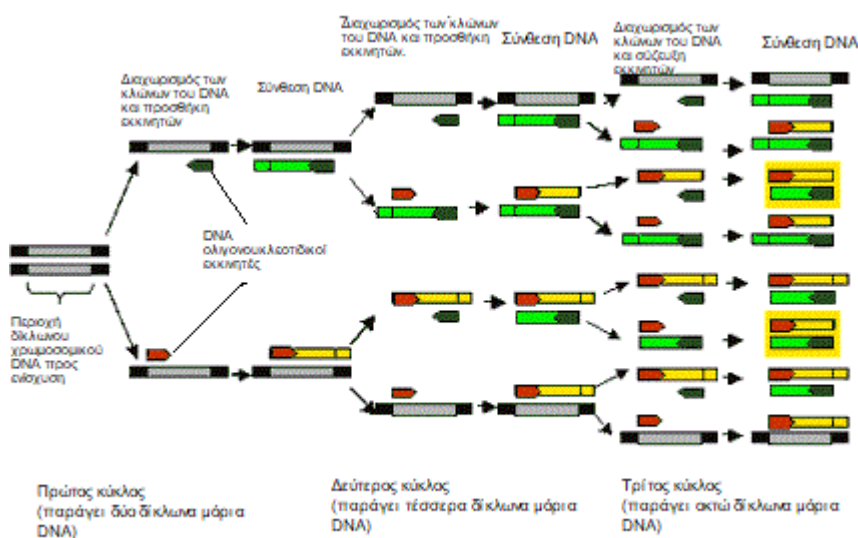
σκοπό να γίνει ο διαχωρισμός των δύο κλώνων του DNA (διάσπαση των δεσμών υδρογόνου).

- **Το στάδιο υβριδισμού των εκκινητών (annealing):** στο στάδιο αυτό, πραγματοποιείται η σύνδεση των εκκινητών σε καθένα από τους δύο κλώνους του DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού της αντίδρασης PCR (περίπου 50 και 62°C) εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις θερμοδυναμικές ιδιότητες των εκκινητών. Δείκτης των ιδιοτήτων αυτών, είναι η θερμοκρασία υβριδισμού του 50% των μορίων του εκκινητή στο μόριο DNA (θερμοκρασία T_m). Η T_m θερμοκρασία εξαρτάται κατά βάση από το ποσοστό σε βάσεις γουανίνης-κυτοσίνης (GC content), αλλά και από το μήκος του εκκινητή. Έτσι, όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό γουανίνης-κυτοσίνης και το μήκος του εκκινητή, τόσο μεγαλύτερη κατά κανόνα είναι η T_m . Αντίστοιχα, ισχύει ότι, όσο μεγαλύτερη είναι η θερμοκρασία T_m , τόσο μεγαλύτερη μπορεί να είναι και η θερμοκρασία υβριδισμού της αντίδρασης PCR. Ένας τύπος υπολογισμού της θερμοκρασίας T_m είναι ο : $T_m = 2(A+T)+4(G+C)$ όπου A, T, G, C είναι ο αριθμός των νουκλεοτιδίων αδενίνης, θυμίνης, γουανίνης, κυτοσίνης στον εκκινητή. Με βάση την T_m των εκκινητών και μετά από πειραματισμό, συνήθως, προκύπτει η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού στην αντίδραση PCR.
- **Το στάδιο επιμήκυνσης (extension):** στο στάδιο αυτό (περίπου 70-72°C) εκδηλώνεται η ενζυμική δράση της πολυμεράσης και πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων. Στο τέλος του σταδίου αυτού έχουν διπλασιαστεί τα μόρια DNA της περιοχής υπό ενίσχυση και ολοκληρώνεται ένας κύκλος της αντίδρασης PCR. Η διάρκεια του κύκλου δεν υπερβαίνει κατά κανόνα τα δύο λεπτά. Συνεπώς, ένα τυπικό πρόγραμμα PCR που περιλαμβάνει 35 κύκλους, είναι δυνατόν σε λίγο χρόνο (λιγότερο από δύο ώρες) να πάρουμε μεγάλο αριθμό μορίων (ενίσχυση της τάξεως των 2 μορίων). Στο τυπικό πρόγραμμα της PCR περιλαμβάνονται επίσης : α) ένα στάδιο αρχικής αποδιάταξης (94°C συνήθως για δύο-τρία λεπτά), ώστε να γίνει πλήρης αποχωρισμός των αλυσίδων του ολικού DNA και β) ένα στάδιο τελικής επιμήκυνσης (72°C συνήθως για τρία-πέντε λεπτά) με σκοπό να γίνει πλήρης σύνθεση όλων των μορίων που έχουν συντεθεί από τη διαδικασία (Mullis και Fallona, 1987, Rolfs, 1992). Το βασικό προϊόν της εκθετικής αυτής αντίδρασης είναι ένα δίκλωνο τμήμα DNA, τα άκρα του οποίου ορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών και έχει μήκος ίσο με την απόσταση των

ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ.



(A)



(B)

Εικόνα 4.2.2 : (A) τα στάδια της PCR και (B) σχηματική απεικόνιση των κύκλων της

Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων της PCR, δηλαδή των προϊόντων, γίνεται με την εφαρμογή της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης μαζί με μοριακούς δείκτες, τα μεγέθη των οποίων είναι γνωστά (molecular markers). Στη περίπτωση που απαιτείται μεγάλη ακρίβεια στο διαχωρισμό των μορίων DNA (π.χ. αλληλούχιση), προτιμάται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Diffenbach, 2003). Έτσι, μπορούμε να διαπιστώσουμε αν το προϊόν της PCR έχει το αναμενόμενο μέγεθος. Τα προϊόντα της PCR γίνονται ορατά με τη χρώση των προϊόντων PCR με ειδική χρωστική (fluorescent DNA loading dye), η οποία φθορίζει έντονα κάτω από τις υπεριώδεις ακτίνες UV όταν συγκεντρώνονται στις περιοχές DNA προϊόντων της PCR, εάν παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών των βάσεων του δίκλωνου DNA (Hunt, 2006). Το fluorescent DNA loading dye μπορεί να ενσωματωθεί στη πηκτή αγαρόζης πριν την ηλεκτροφόρηση ή να εμβαπτιστεί η πηκτή σε διάλυμα του, μετά την

ηλεκτροφόρηση. Τα πλεονέκτημα της PCR είναι η ταχύτητα ανάλυσης και το ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολύ μικρές ποσότητες αρχικού δείγματος ιστού από το οποίο θα απομονωθεί το DNA, ενώ τα προϊόντα της μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μεγάλο εύρος αναλύσεων του γενετικού υλικού. Όμως, συχνά είναι απαραίτητο να προϋπάρχει κάποια γνώση για την αλληλουχία που θα εξεταστεί. Επιπλέον, το μέγεθος της αλληλουχίας δεν μπορεί να υπερβαίνει μερικές χιλιάδες βάσεων. Τέλος, υφίστανται και ο κίνδυνος επιμόλυνσης του υπό ενίσχυση DNA.

5. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, ήταν η ανάπτυξη μοριακών δεικτών, για την ταυτοποίηση και τη διάκριση του χοιρινού κρέατος που προέρχεται από την φυλή του ελληνικού μαύρου χοίρου. Οι μοριακοί δείκτες, που εξετάστηκαν ήταν τα γονίδια του κυτοχρώματος β (Cytb) και της υπομονάδας III της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COXIII) του μιτοχονδριακού DNA. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων, με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές για την ανίχνευση της φυλής-στόχου (κρέας μαύρου χοίρου), σε τυποποιημένα κρεατοπαρασκευάσματα, στα οποία αναγραφόταν η ύπαρξη ποσοστού κρέατος από μαύρο χοίρο.

6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 14 δείγματα κρεατοπαρασκευασμάτων, τα οποία περιείχαν κρέας από ελληνικό μαύρο χοίρο, εγχώριο ελληνικό χοίρο (αγριογούρουνο) και εκτρεφόμενες φυλές χοίρων. Τα δείγματα μας ήταν τα παρακάτω :

Δείγματα	Συστατικά	Ημερομηνία λήξης
Αγριογούρουνο Φάρμα Φωτιάδη	Κρέας χοιρινό Ε.Ε 70%, κρέας αγριόχοιρου ελληνικού 24%	2/7/17
Αγριογούρουνο Φάρμα Φωτιάδη	Κρέας χοιρινό Ε.Ε 70%, κρέας αγριόχοιρου ελληνικού 24%	6/8/17
Λουκάνικο Μαύρου Χοίρου Α.Β.	Ελληνικό χοιρινό κρέας 70%	26/7/17
Λουκάνικο Χωριάτικο του Κυνηγού	Κρέας χοιρινό Ε.Ε 65%, κρέας ελληνικού αγριόχοιρου 22%	18/7/17
Λουκάνικο με Ελληνικό Μαύρο Χοίρο Φάρμα Φωτιάδη	Κρέας χοιρινό Ε.Ε 74%, κρέας ελληνικό μαύρου χοίρου 22%	9/7/17
Λουκάνικο με Ελληνικό Μαύρο Χοίρο Φάρμα Φωτιάδη	Κρέας χοιρινό Ε.Ε 74%, κρέας ελληνικό μαύρου χοίρου 22%	9/7/17
Λουκάνικο Καπνιστό με Αγριόχοιρο	Κρέας χοιρινό Ε.Ε 74%, κρέας ελληνικού αγριόχοιρου 24%	13/8/17
Χωριάτικο Λουκάνικο Κυνηγού με Αγριόχοιρο	-	27/8/17
Χωριάτικο Λουκάνικο Κυνηγού με Αγριόχοιρο	-	31/7/17
Λουκάνικο με Αγριόχοιρο και Λιαστή Ντομάτα	Κρέας χοιρινό Ε.Ε 63%, κρέας ελληνικό αγριόχοιρου 21%	11/9/17
Λουκάνικο με Κεφαλογραβιέρα Π.Ο.Π.	Κρέας χοιρινό Ε.Ε 64%, κρέας ελληνικό αγριόχοιρου 21%	4/9/17
Λουκάνικο Χοιρινό και Μοσχάρι	Κρέας χοιρινό 30%, κρέας μοσχαρίσιο 30%, λίπος 23%	-
Λουκάνικο Ηπείρου	Κρέας χοιρινό 78%, λίπος χοιρινό, Μ.Δ.Κ κοτόπουλο	30/12/15
Ελασσόνα Εκτρεφόμενο Άγριο	Κρέας χοιρινό	-

6.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), που περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια :

1. Παίρνουμε το δείγμα το τεμαχίζουμε και το τοποθετούμε τον ιστό σε φιαλίδιο Eppendorf των 1.5 μl.
2. Προσθέτουμε 180 μl Genomic Digestion buffer και 20 μl πρωτεϊνάση K και αναδεύουμε.
3. Επωάζουμε τα δείγματα στους 55° C για περίπου 2 ώρες υπό συνεχή ανάδευση μέχρι το δείγμα να διαλυθεί.
4. Τοποθετούμε τα δείγματα στη φυγόκεντρο σε θερμοκρασία δωματίου στις 13.000 στροφές για 3 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο φιαλίδιο Eppendorf των 2 μl.
5. Προσθέτουμε 20 μl RNase A και αναδεύουμε στο Vortex.
6. Προσθέτουμε 200 μl Genomic lysis binding buffer και αναδεύουμε ξανά στο Vortex.
7. Στη συνέχεια προσθέτουμε 200 μl αιθανόλη (EtOH) 100% και αναδεύουμε έντονα.
8. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε ειδικά Eppendorf με στήλες.
9. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 1 λεπτό.
10. Προσθέτουμε 500 μl Wash buffer 1 και φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 1 λεπτό.
11. Μεταφέρουμε τη στήλη του Eppendorf σε νέα βάση, προσθέτουμε 500 μl Wash buffer 2 και φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 3 λεπτά.
12. Τοποθετούμε τη στήλη σε Eppendorf των 1.5 μl και προσθέτουμε 100 μl Elution buffer.
13. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 2 λεπτά.
14. Τέλος, αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4° C για άμεση χρήση και στους -20° C για μελλοντική χρήση.

6.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA

Η συνολική ποσότητα του DNA στο εκάστοτε δείγμα ελέγχεται, είτε με φωτομέτρηση του δείγματος, είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Πρόκειται για μια διαδικασία ποιοτικού προσδιορισμού και διαχωρισμού τμημάτων DNA που μας δίνει τη δυνατότητα να πάρουμε πληροφορίες για το μέγεθος των γραμμικών μορίων, τη ποιότητα αλλά και τη ποσότητα του DNA. Στη παρούσα εργασία, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε σε τρεις φάσεις. Αρχικά για την απομόνωση του DNA από τους ιστούς των ζωικών οργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν -για τον έλεγχο του μιτοχονδριακού DNA-, στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε μετά την ολοκλήρωση της PCR -για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης- και τέλος μετά το καθαρισμό των δειγμάτων -για τον έλεγχο του προϊόντος-. Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος και τη στερεοδιάταξή τους (π.χ. η υπερελικωμένη κυκλική μορφή, η ανοιχτή κυκλική μορφή και η γραμμική μορφή DNA του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πήκτωμα αγαρόζης). Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται άμεσα, λόγω της προσθήκης χρωστικής Fluorescent DNA loading dye, της εταιρείας GeneOn. Όσο μεγαλύτερη είναι η τάση του πεδίου τόσο πιο γρήγορη είναι η μετακίνηση των μορίων. Η τάση όμως δεν γίνεται να είναι πολύ υψηλή, γιατί αναπτύσσονται μεγάλες θερμοκρασίες και προκαλείται το λιώσιμο της πηκτής. Φορτώνοντας το DNA σε μια πηκτή που περιέχει τη χρωστική και εκθέτοντας το στο υπεριώδες φως γίνονται ορατές οι διακριτές μπάντες του DNA, καθώς αυτό παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer ώστε να γίνεται εφικτή η παρακολούθηση της μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση και να κατακάθονται τα δείγματα στις θέσεις της πηκτής λόγω της μεγαλύτερης πυκνότητάς τους. Συνήθως, χρησιμοποιούνται το κυανό του ξυλένιου και το μπλε της βρωμοφαινόλης. Τα loading buffers περιέχουν ως επί το πλείστον γλυκερόλη, σουκρόζη και φυκόλη, έτσι ώστε καταβυθίζεται το DNA καθώς και χρωστικές για να είναι εύκολη η παρατήρηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Τα κυριότερα buffers που χρησιμοποιούνται στις ηλεκτροφόρησεις αγαρόζης είναι το TAE (Tris acetate EDTA) και το TBE (Tris borate EDTA). Το TAE προσφέρει καλύτερη ανάλυση για μεγάλα τμήματα DNA. Αυτό σημαίνει χαμηλότερη τάση, περισσότερος χρόνος αλλά καλύτερο προϊόν.

Για τη τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα:

TAE 50X (500 ml)

Tris base 2M

Acetic Acid 7.7%

EDTA 0.05M

ddH₂O έως τα 500 ml

Loading buffer (6x 10 ml)

Bromophenol blue 0.1% w/v

TBE 1X

Glycerol 8.7%

ddH₂O έως τα 10 ml

Αρχικώς, παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1X αραιώνοντας το πυκνό διάλυμα 50x (20 ml σε τελικό όγκο 1lt). Για την προετοιμασία της πηκτής διαλύουμε 0.6gr αгарόξης σε 30 ml TAE 1x (τελική συγκέντρωση 2% w/v) με θέρμανση και προσθέτουμε 3 ml fluorescent DNA loading dye, σε τελική συγκέντρωση 1 mg/ml. Η συγκέντρωση της πηκτής αгарόξης διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν.

Για την προετοιμασία της πηκτής αгарόξης πραγματοποιήθηκε η παρακάτω διαδικασία :

1. Προετοιμασία του εκμαγείου στο οποίο θα στερεοποιηθεί η πηκτή.
2. Προετοιμασία πηκτής, όπου χρησιμοποιήθηκαν 0.6 gr αгарόξης και 30 ml TAE 1x για τη Παρασκευή διαλύματος 2%.
3. Βράσιμο του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων. Κατά το βράσιμο πρέπει να γίνεται συχνή ανάδευση του διαλύματος.
4. Το διάλυμα ανακινείται μέχρι να κρυώσει.
5. Προστίθενται 1 μ.L fluorescent DNA loading dye
6. Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο.

7. Εισάγεται το χτενάκι στη πηκτή για να σχηματιστούν οι θέσεις στις οποίες θα εισαχθεί το DNA.
8. Όταν η πηκτή στερεοποιηθεί αφαιρείται το χτενάκι.
9. Τοποθέτηση της πηκτής μαζί με τη μήτρα σε μια συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1x.
10. Στη περίπτωση ελέγχου της απομόνωσης αναμειγνύουμε 3 μl loading buffer με 2 μl DNA. Στη περίπτωση ελέγχου της αντίδρασης PCR αναμειγνύουμε 3 μl loading buffer με 5 μl DNA (PCR προϊόν). Στη περίπτωση ελέγχου του καθαρισμού αναμειγνύουμε 3 μl loading buffer με 3 μl DNA (καθαρού PCR προϊόντος). Κατόπιν, εισαγωγή των δειγμάτων στις θέσεις της πηκτής.

Η τάση ρυθμίζεται έτσι ώστε να είναι 150V. Μετά από 30 λεπτά είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στη πηκτή αφού τοποθετηθεί στη συσκευή U.V.

6.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης, όπως προαναφέραμε είναι μια μέθοδος που επιτρέπει τον *in vitro* ενζυμικό πολλαπλασιασμό επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος. Στη διάρκεια της αντίδρασης χρησιμοποιείται ένα κατάλληλο ζεύγος εκκινητών (primers), οποίοι είναι συνθετικά μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια μήκους 15-30 βάσεων, με αλληλουχία συμπληρωματική το καθένα για μια από τις αλυσίδες του DNA και οριοθετούν την αλληλουχία που επιθυμούμε να ενισχύσουμε. Παρουσία του κατάλληλου ζεύγους εκκινητών, περίσσειας των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (d ATP, d CTP, d GTP και d TTP), ιόντων μαγνησίου και της κατάλληλης DNA πολυμεράσης επιτυγχάνεται η αντίδραση πολυμερισμού.

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις :

- Στην εκθετική (exponential) φάση : όπου, έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σ' αυτή τη φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA.
- Στη γραμμική (linear) φάση : όπου, παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA λόγω της μείωσης της ενεργητικότητας των αντιδραστηρίων.

- Στη φάση Plateau : όπου, έχει σταματήσει η αντίδραση της PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων λόγω της εξάντλησης των αντιδραστηρίων. (Applied Biosystems, 2003)

Η μέθοδος της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Κάθε κύκλος της PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια και έχει ως αποτέλεσμα τον εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου.

Τα τρία στάδια του κάθε κύκλου της PCR είναι τα ακόλουθα:

- Αποδιάταξη : το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνα, μέσω της θέρμανσης του σε υψηλή θερμοκρασία (94° C – 95° C).
- Υβριδοποίηση εκκινητών : οι δύο εκκινητές υβριδοποιούνται με τις αποδιατεταγμένες αλυσίδες του DNA. Η θερμοκρασία εξαρτάται από την αλληλουχία των εκκινητών (50° C – 65° C).
- Επέκταση των εκκινητών (πολυμερισμός) : σύνθεση DNA με επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5' – 3', χρησιμοποιώντας τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια και έχοντας ως εκμαγείο τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA.

Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από μία θερμοσταθερή DNA πολυμεράση.

Για τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων των γονιδίων Cytb και COXIII, σχεδιάσαμε εκκινητές βάσει κατατεθειμένων αλληλουχιών της φυλής των μαύρων χοίρων (Alves, 2009).

Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρουσιάζονται στον πίνακα 6.4.1 :

Πίνακας 6.4.1 : Αλληλουχίες εκκινητών

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
Cytb – Fw	TCC-TAG-AAA-CAT-GAA-ACA-TTG-GAG-T
Cytb – Rv	GTA-GGG-TTG-TTG-GAT-CCG-GT
Cox3 – Fw	CCT-AGC-ACC-AAC-ACC-CGA-AT
Cox3 - Rv	GGT-GGT-TGG-ATG-TGA-AGT-GGA

Για τη διαδικασία της PCR το πρώτο βήμα είναι η παρασκευή ενός διαλύματος (master mix) το οποίο θα περιέχει, ανά δείγμα, τις ποσότητες αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στο παρακάτω πίνακα. Το διάλυμα παρασκευάζεται ανάλογα με

τον αριθμό των δειγμάτων. Στη συνέχεια τοποθετούμε σε φιαλίδια Eppendorf 1μl εκμαγείου DNA το οποίο αντιστοιχεί σε ποσότητα των 50 ng περίπου.

Τα συστατικά και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων παρουσιάζονται στον πίνακα 6.4.2 :

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR ΤΩΝ 50 μL	ΤΕΛΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR
DNA εκμαγείο	1 μL	-
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X	5μL	1X
MgCl ₂ (50 mM)	1μL	1mM
dNTPs (40mM)	1μL	0,8mM
Εκκινητής Forward (50pmol/μL)	1μL	1pmol/μL
Εκκινητής Reverse (50mol/μL)	1μL	1pmol/μL
Taq DNA πολυμεράση (5U/μL)	0.2μL	1 unit/αντίδραση
ddH ₂ O	40 μL	-

Πίνακας 6.4.2 : Συστατικά και ποσότητες των αντιδραστηρίων της PCR

Στη συνέχεια μοιράζουμε σε κάθε Eppendorf που περιέχει το DNA, από 49 μl του master mix. Επίσης, σε ένα Eppendorf το οποίο δεν περιέχει DNA βάζουμε master mix (μάρτυρας) ώστε να συγκρίνουμε το προϊόν PCR με τον μάρτυρα. Τέλος τοποθετούμε τα δείγματα στο θερμοκυκλοποιητή ο οποίος προγραμματίζεται να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας/χρόνου.

Οι συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου Cytb είναι :

- **Αρχική αποδιάταξη** : 95o C για 4min
- **Αποδιάταξη** : 95o C για 40sec
- **Υβριδοποίηση** : 53o C για 50sec
- **Επιμήκυνση** : 72o C για 40sec
- **Τελική επιμήκυνση** : 72o C για 10min

Μετά το τέλος της PCR, γίνεται η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, για να ελέγξουμε την επιτυχία της διαδικασίας, όπως αναφέραμε προηγουμένως στην παράγραφο... Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Μετά το διαχωρισμό των τμημάτων του DNA, το προϊόν της PCR μπορεί να ανιχνευθεί από το αναμενόμενο μέγεθός του, το οποίο προσδιορίζεται από τη σύγκριση με τα τμήματα (Dieffenbach, 2003). Τα δείγματα που δίνουν θετικό αποτέλεσμα (ανίχνευση ζωνών) πριν σταλούν για ταυτοποίηση της DNA αλληλουχίας τους (DNA sequencing) υπόκεινται σε καθαρισμό.

6.5 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

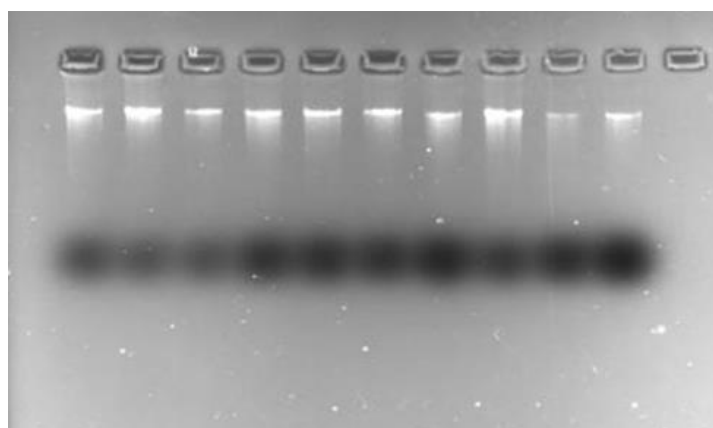
Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων έγινε με το SureClean Plus kit της Bioline. Η διαδικασία καθαρισμού που πραγματοποιήθηκε είναι:

- Στα Eppendorf που περιέχουν το PCR προϊόν προστίθενται 6 μl της ροζ χρωστικής που περιέχεται στο kit και ακολουθεί ανάδευση στο Vortex για 30 δευτερόλεπτα.
- Στη συνέχεια, στα δείγματα προστίθενται 40 μl διαλύματος SureClean και ακολουθεί έντονη ανάδευση στο Vortex για 30 δευτερόλεπτα.
- Τα δείγματα επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000 στροφές για 10 λεπτά. Όπου έκανε την εμφάνιση του ένα ροζ ίζημα στη βάση του φιαλιδίου.
- Κατόπιν, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό και προστέθηκε 80 μl αιθανόλη συγκέντρωσης 70% και ακολούθησε ανάδευση στο Vortex για 30 δευτερόλεπτα.
- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000 στροφές για 10 λεπτά και αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού. Τα Eppendorf τοποθετήθηκαν σε συσκευή επώασης στους 37° C με ανοιχτά καπάκια μέχρι τη πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης.
- Τέλος, προστέθηκαν 20 μl ddH₂O για την επαναδιαλυτοποίηση του DNA.

7.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA

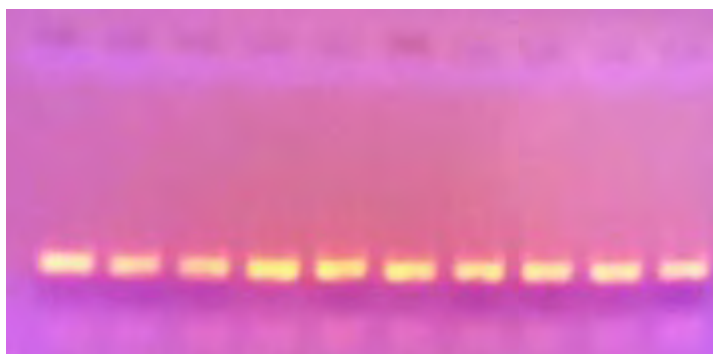
Η απομόνωση του DNA έγινε με τη διαδικασία που έχει αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο και ο έλεγχος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στην εικόνα 7.1.1 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της απομόνωσης σε πήκτωμα αγαρόζης με τη χρήση της χρωστικής Fluorescent DNA loading dye (GeneOn).



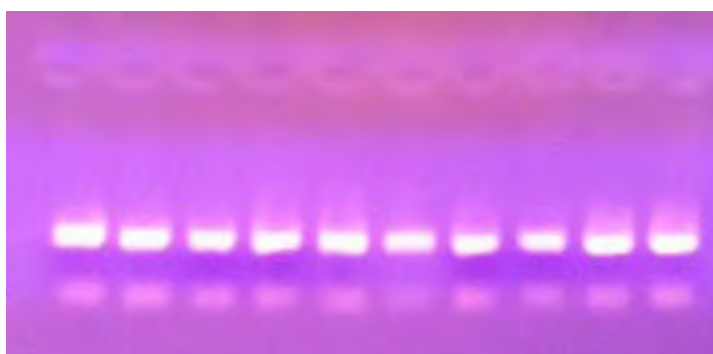
Εικόνα 7.1.1 : Ενδεικτική απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης γενωμικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στην εικόνα απεικονίζονται δείγματα DNA από 10 κρεατοπαρασκευάσματα.

7.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Στη συνέχεια, πολλαπλασιάσαμε με την PCR τμήματα των γονιδίων Cytb και COXIII του μιτοχονδριακού DNA, για όλα τα δείγματα, μετά από επιτυχή απομόνωση DNA. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2%, για τον έλεγχο της ενίσχυσης επιθυμητού τμήματος των γονιδίων. Οι εικόνες 7.2.1 και 7.2.2 είναι ενδεικτικές της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR για τα δύο τμήματα των γονιδίων, σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.



Εικόνα 7.2.1 : Αποτελέσματα ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου Cytb σε 10 δείγματα DNA



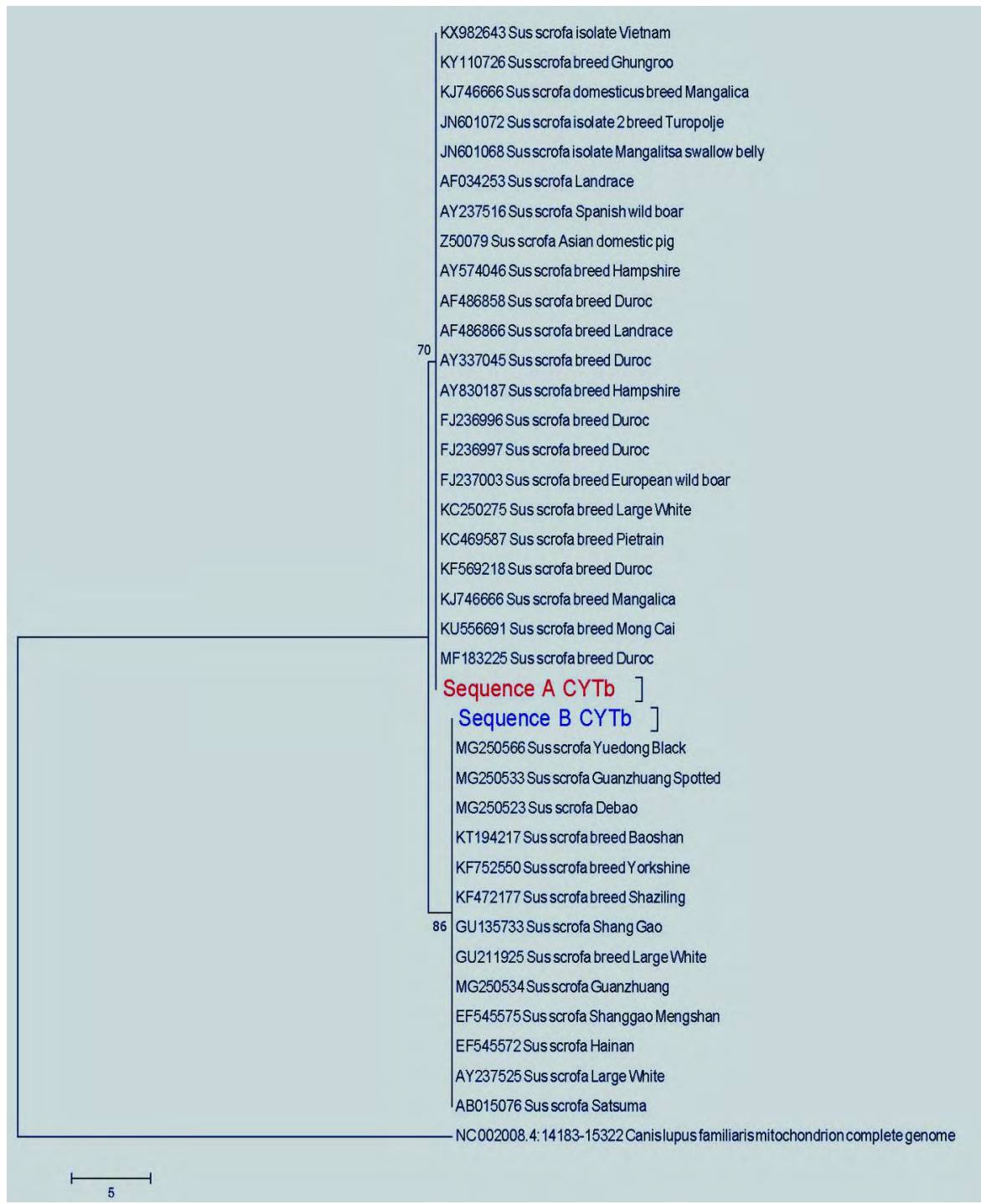
Εικόνα 7.2.2 : Αποτελέσματα ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου COXIII σε 10 δείγματα DNA

7.3 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

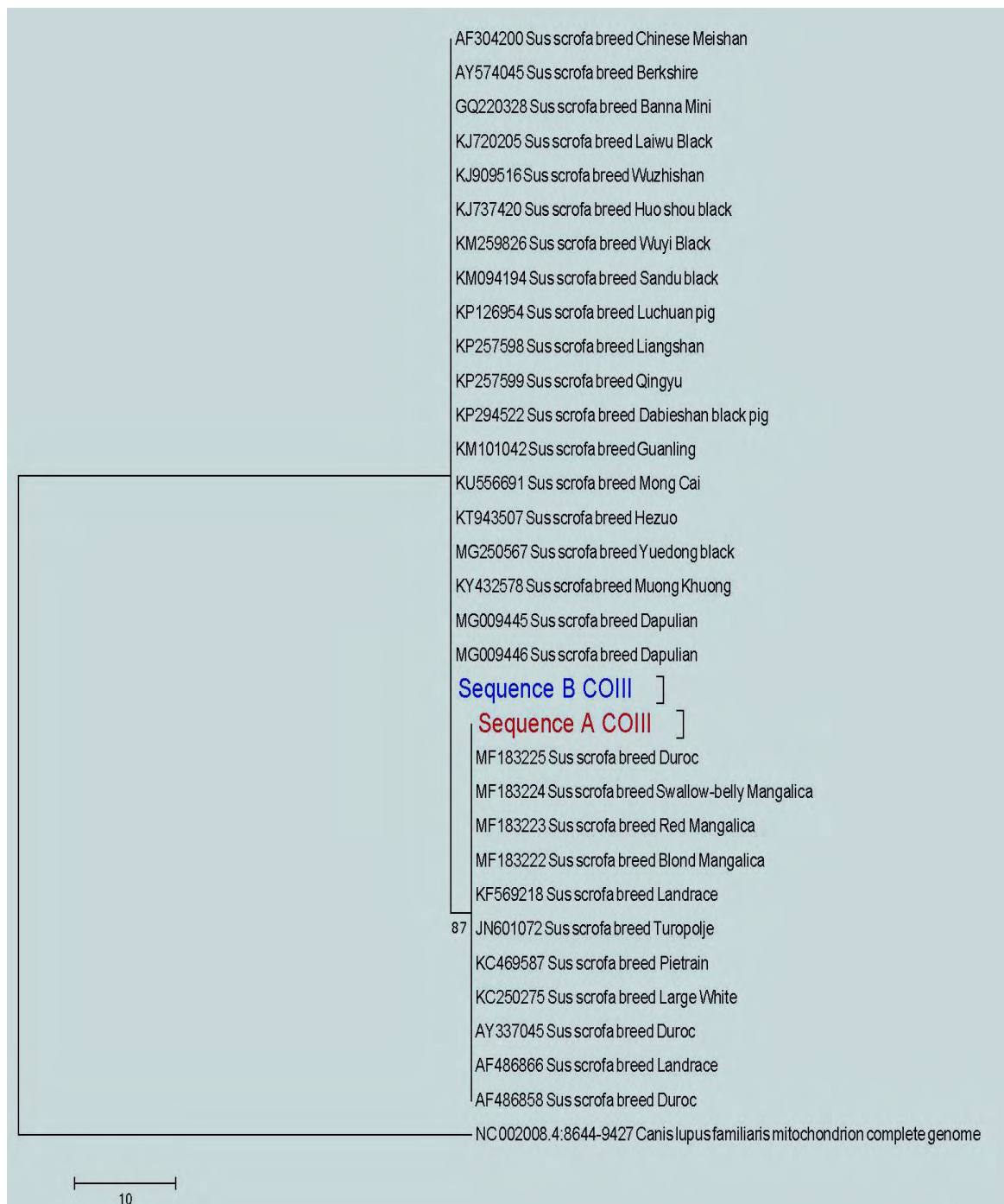
Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε και με τους δύο εκκινητές που είχαμε επιλέξει για την ενίσχυση των PCR προϊόντων. Το μέγεθος των τμημάτων που προέκυψαν και για τα 2 γονίδια, μετά την αλληλούχηση, ήταν 380 bp για το COXIII και 301 bp για το Cytb. Τα αρχεία των αλληλουχιών αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit® και οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν με τον αλγόριθμο ClustalX για να βρεθούν οι περιοχές ομολογίας. Μετά από την ανάλυση των αλληλουχιών των 14 δειγμάτων, προέκυψαν 2 αλληλουχίες για κάθε ένα γονίδιο. Από την ανάλυση των χρωματογραφήματων του κάθε δείγματος εντοπίστηκαν οι θέσεις διαφοροποίησης των αλληλουχιών για κάθε ένα τμήμα γονιδίου. Οι 2 αλληλουχίες που προέκυψαν για κάθε ένα τμήμα γονιδίου παρουσιάζονται στις εικόνες 7.3.1 και 7.3.2.

7.4 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΛΩΝ

Οι δύο αλληλουχίες που προέκυψαν ξεχωριστά για κάθε γονίδιο, συγκρίθηκαν με τις αλληλουχίες που είναι καταχωρημένες στην παγκόσμια βάση δεδομένων National Center for Biotechnology Information (NCBI), χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο BLASTn. Βάσει των αποτελεσμάτων της σύγκρισης, οι κατατεθειμένες αλληλουχίες από διάφορες φυλές του είδους *Sus scrofa*, σε παγκόσμιο επίπεδο, οι οποίες, εμφάνισαν κάλυψη και ομοιότητα 100%, χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων, μαζί με τις αλληλουχίες που προέκυψαν από την ανάλυση της αλληλούχησης των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα, όσον αφορά την ταυτοποίηση των φυλών, από τις οποίες προέρχονται οι αλληλουχίες των δειγμάτων, καθώς και οι σχέσεις αυτών με τις φυλές των κατατεθειμένων αλληλουχιών, παρουσιάζονται στα δύο φυλογενετικά δέντρα, που δημιουργήθηκαν για τα δύο γονίδια ξεχωριστά, με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA7 (Εικ. 7.4.1 και Εικ. 7.4.2). Στην Εικ. 7.4.1 παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο, που δημιουργήθηκε από τις αλληλουχίες του κυτοχρώματος β (Cytb) ενώ στην Εικ. 7.4.2 παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο, που δημιουργήθηκε από τις αλληλουχίες της υπομονάδας III της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COXIII). Για την καλύτερη οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία από το είδος *Canis lupus familiaris* ως εξωομάδα σε κάθε φυλογενετικό δέντρο. Από την παρατήρηση των δύο φυλογενετικών δέντρων, συμπεραίνουμε ότι οι αλληλουχίες από κάθε γονίδιο, ομαδοποιούνται με διαφορετικές ομάδες φυλών του είδους *Sus scrofa*.



Εικόνα 7.4.1: Φυλογενετικό δέντρο, με τη χρήση των αλληλουχιών του κυτοχρώματος β (Cytb)



Εικόνα 7.4.2: Φυλογενετικό δέντρο, με τη χρήση των αλληλουχιών της υπομονάδας III της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COXIII)

8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στις διατροφικές συνήθειες του σύγχρονου δυτικού κόσμου, το κρέας λόγω της ιδιαίτερα υψηλής διατροφικής του αξίας αποτελεί ένα απαραίτητο κομμάτι της διατροφής. Λόγω της βελτίωσης του επιπέδου ζωής, της κοινωνικής και οικονομικής ευμάρειας η κατανάλωση του κρέατος τα τελευταία χρόνια είναι σε πολύ υψηλά επίπεδα. Έτσι, η εμπορία κρέατος απέκτησε τεράστια δυναμική. Όμως η μεγάλη κατανάλωση και ζήτηση οδήγησε σε μεγάλη παραγωγή με μη σωστές πρακτικές εμπορίας και με στόχο να αποφέρει κέρδος στη βιομηχανία κρέατος. Εξαιτίας αυτής της αύξησης, κρίθηκε απαραίτητη η θέσπιση ενός νόμου πλαίσιο με σκοπό να διασφαλιστεί η σωστή εμπορία και διακίνηση του κρέατος για τη προστασία του καταναλωτή. Λόγω της αύξησης των φαινομένων νοθείας σε κρέας έκανε αυτή την ανάγκη ακόμα πιο επιτακτική. Έγινε προσπάθεια με τη χρήση της επισήμανσης και της ιχνηλασιμότητας να ελεγχθεί η αυθεντικότητα του κρέατος, χωρίς όμως να έχουν εξαλειφθεί τα φαινόμενα νοθείας. Η ανησυχία όμως, των καταναλωτών λόγω επιτηδευμένων ή εσφαλμένων επισημάνσεων και των διαφόρων διατροφικών σκανδάλων (π.χ. γρίπη των πουλερικών, η Σπογγώδεις Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών, σκάνδαλο νοθείας κρέατος αλόγου κ.α.) είχε σαν αποτέλεσμα την ανάγκη για αναζήτηση πιο ασφαλών και δραστικών μεθόδων. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί πολυάριθμες αναλυτικές μέθοδοι για την αναγνώριση των ειδών των ζωικών ιστών στα προϊόντα κρέατος. Στη παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές με στόχο την ταυτοποίηση και διάκριση του χοιρινού κρέατος που προέρχεται από τη φυλή του ελληνικού μαύρου χοίρου. Οι μοριακοί δείκτες, που χρησιμοποιήσαμε ήταν τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου COXIII και τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου Cytb του μιτοχονδριακού DNA. Η ενίσχυση του γονιδίου έγινε με τη τεχνική της PCR, με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές για την ανίχνευση της φυλής - στόχου (κρέας μαύρου χοίρου) σε τυποποιημένα κρεατοσκευάσματα. Το μέγεθος των τμημάτων που προέκυψαν και για τα 2 γονίδια, μετά την αλληλούχηση, ήταν 380 bp για το COXIII και 301 bp για το Cytb. Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα BioEdit[®] και οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν με τον αλγόριθμο ClustalIX, με σκοπό να βρεθούν οι περιοχές ομολογίας. Από την ανάλυση των αλληλουχιών προέκυψαν δύο αλληλουχίες για κάθε τμήμα γονιδίου ξεχωριστά. Διερευνήσαμε την ομολογία των προς εξέταση αλληλουχιών μέσω του αλγόριθμου BLAST στην παγκόσμια βάση δεδομένων του NCBI. Από την ανάλυση προέκυψε ότι οι αλληλουχίες των δειγμάτων ανήκουν στο είδος *Sus scrofa* και στο υποείδος *Sus scrofa domestica* και ομαδοποιούνται με διάφορες φυλές του είδους *Sus scrofa* σε παγκόσμιο επίπεδο. Στη συνέχεια προχωρήσαμε στη κατασκευή 2 φυλογενετικών δέντρων, ένα για κάθε γονίδιο, χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων με 100% ομολογία για κάθε αλληλουχία ξεχωριστά.

Στο πρώτο φυλογενετικό δέντρο, που δημιουργήθηκε από τις αλληλουχίες του γονιδίου Cytb, η πρώτη αλληλουχία (sequence A Cytb), έχει 100% ομοιότητα με τις αλληλουχίες ατόμων που προέρχονται, κυρίως, από φυλές εξημερωμένων και εκτρεφόμενων χοίρων, που εντοπίζονται στην Ευρώπη, του είδους *Sus scrofa domestica*, αλλά και με 3 αλληλουχίες από άτομα, που ανήκουν στο είδος *Sus scrofa scrofa*, (δύο από ασιατικές φυλές και ενός αγριογούρουνου από τον ευρωπαϊκό χώρο). Η δεύτερη αλληλουχία (sequence B Cytb), έχει 100% ομοιότητα με τις αλληλουχίες ατόμων που προέρχονται, κυρίως, από αυτόχθονες φυλές μαύρων χοίρων του είδους *Sus scrofa scrofa*, που εντοπίζονται στην Ασία, αλλά και με 2 αλληλουχίες από άτομα, που ανήκουν σε φυλές εξημερωμένων και εκτρεφόμενων χοίρων, που εντοπίζονται στην Ευρώπη, του είδους *Sus scrofa domestica*. Στο δεύτερο φυλογενετικό δέντρο που δημιουργήθηκε από τις αλληλουχίες του γονιδίου COXIII, η πρώτη αλληλουχία (sequence A COXIII), έχει 100% ομοιότητα με τις αλληλουχίες ατόμων που προέρχονται, κυρίως, από φυλές εξημερωμένων και εκτρεφόμενων χοίρων, που εντοπίζονται, κυρίως, στην Ευρώπη αλλά και δύο εκτρεφόμενων φυλών της Κίνας, του είδους *Sus scrofa domestica*, ενώ η δεύτερη (sequence B COXIII), έχει 100% ομοιότητα με τις αλληλουχίες ατόμων που προέρχονται, κυρίως, από αυτόχθονες φυλές μαύρων χοίρων του είδους *Sus scrofa scrofa*, που εντοπίζονται στην Ασία.

Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων μπορούμε να συμπεράνουμε, ως ένα βαθμό, ότι η μία αλληλουχία από τις δύο, που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων προέρχεται από κρέας ελληνικού μαύρου χοίρου, το οποίο διαφοροποιείται από τις διαδεδομένες εκτρεφόμενες φυλές (Landrace, Large White, Duroc, Yorkshire, Pietrain) και έχει 100% ομοιότητα με διάφορες αυτόχθονες φυλές μαύρων χοίρων, κυρίως ασιατικών χωρών. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με ιστορικά δεδομένα που αναφέρουν ότι η εξημέρωση του χοίρου έλαβε χώρα πριν εννέα χιλιετίες περίπου, σε διάφορες περιοχές της Ασίας.

Θα ήταν σκόπιμο στο σημείο αυτό να αναφέρω και τον λόγο τον οποίο η εργασία μου στηρίχθηκε στον Ελληνικό Μαύρο Χοίρο. Μπορεί να αναρωτηθεί κανείς για ποιο λόγο ερευνάμε και προσπαθούμε να αναβιώσουμε αυτή τη φυλή μιας και σε σύγκριση με τις υπόλοιπες είναι λιγότερο αποδοτική. Η διάσωση των αυτόχθονων εγχώριων φυλών έχει σημαντικές προεκτάσεις. Ο μαύρος χοίρος είναι αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφικής και πολιτιστικής μας παράδοσης. Φυλές σαν και αυτή έχουν επιβιώσει επί χιλιετίες και έτσι μπορούν να αντιμετωπίσουν τις αντιξοότητες (όπως οι διάφορες ασθένειες, ακραίες καιρικές συνθήκες, έλλειψη τροφής κ.α.) με αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα. Πιστεύω πως τα εγχώρια ποιοτικά προϊόντα είναι μια απάντηση στις πρακτικές της παγκοσμιοποίησης. Λόγω των πολλών διατροφικών σκανδάλων, η επιστροφή σε κάτι αγνό και ποιοτικό είναι σημαντική.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Stryer I., (1997), Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
- Αλαχιώτης Σ., (2005), Εισαγωγή στη Γενετική Εκδόσεις Ελληνικά Γράμματα.
- Αρβανιτογιάννης Σ.Ιωάννης , (2006), Το Νέο πρότυπο ποιότητας και ασφάλειας τροφίμων ISO 22000: Παρουσίαση & Ερμηνεία, Εκδόσεις Σταμούλη.
- Γεωργάκης ΣΠ.Α., (2005), Το Κρέας και Τα Προϊόντα Του, Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία.
- Γούλας Π. (2002), Τεχνολογία Κρέατος, Εκδόσεις Τ.Ε.Ι Λάρισας
- Διαμαντίδης Χρ.Γρηγόρης, (1994), Εισαγωγή στη Βιοχημεία, Εκδόσεις University Studio Press.
- Κατσαούνης Ν.Κ., Σπαής Α.Β., (1998), Χοιροτροφία, Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία.
- Κανονισμός (Ε.Κ) 178/2002 «για τον καθορισμό των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα , για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των τροφίμων και τον καθορισμό διαδικασιών σε θέματα ασφάλειας των τροφίμων». Επίσημη Εφημ. Κοινот. Αριθμ. L31, 01/02/2002.
- Κουτσουνάκης Κ., (2008), Σημειώσεις : Ποιοτικός Έλεγχος και Διασφάλιση Ποιότητας.
- Μπλούκας Ι., (2007), Τεχνολογία Κρέατος, εκδ. οργ. Σταμούλη Αθήνα.
- Νόμος 248/1914 – ΦΕΚ Α 110/Α/25-4-1914 «Περί οργανώσεως της Ζωοτεχνικής και Κτηνιατρικής Υπηρεσίας». Επίσημη Εφημ. Της Κυβ.του Βας. Της Ελλάδος Αριθμ. Φυλ. 110.
- Συστήματα διαχείρισης της ποιότητας – Θεμελιώδεις αρχές και λεξιλόγιο (2000). Πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 9000.

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- *Applied Biosystems (2003), Real Time PCR vs Traditional PCR.*
- *Berg, J.M, (2002), Biochemistry.*
- *Bogenhagen, D. F., (2009), Biochemical isolation of mtDNA nucleoids from animal Cells. In J. A. Stuart (Ed.), Mitochondrial DNA: Methods and protocols. (2nd ed.). New York: Humana Press.*
- *Bohler, E., Schafer, T., Ruhdorfer, S., Weigl, L., Wessner, D., Heinrich, J., et al. (2001). Epidemiology of food allergy in adults. Allergo Journal.*
- *Bostein, D., (1980), Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.*
- *Bruford, M.W., (2003), DNA markers reveal the complexity of livestock domestication.*
- *Clayton, D.A., (1984), Transcription of the mammalian mitochondrial genome. Ann Rev Biochem.*
- *Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S., & Bottero, M. T. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. Molecular and Cellular Probes.*
- *Deligeorgis, S.G., (2004), The first step to conservation of native Greek pig.*
- *Dieffenbach, C.W., (2003), General concepts for PCR primer design.*
- *Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., et al. (2008a). Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (MC1R) genes. Meat Science.*
- *Fariyah Liyana, K., Shuhaimi, M., Che Man, Y. B., Sazili, A. Q., Aida, A. A., & Raha, A. R. (2009). Porcine specific real-time polymerase chain reaction (PCR) for Halal verification. Proceeding paper presented at the 3rd IMT-GT International Symposium on Halal Science and Management, December 2009, KLIA Sepang, Selangor, Malaysia.*
- *Hargin, K.D, (1996), Authenticity issues in meat and meat products.*

- Magoulas, A., (2005). Mitochondrial DNA. In S. X. Cadrin, K. D. Friedland, & J. R. Waldman (Eds.), *Stock identification methods: Applications in fishery science*. Burlington, MA: Elsevier Academic Press.
- Michailidou S., (2014), *A multi – farm assessment of Greek black big genetic diversity using microsatellite molecular markers*.
- Mitterski B., (2000), *PCR/SSCP detects reliably and efficiently DNA sequence variations in large scale screening projects*.
- Mullis KB, Faloona FA. (1987), *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*.
- Scheffler, I.E., (2001), *A century of mitochondrial research : Achievements and perspectives*.
- Stratagene, 2006, *Introduction to Quantitative PCR*. Stratagene, La Jolla, CA.
- Vos P., (1995), *ALFP : A new technique for DNA fingerprinting*.
- Williams J.K., (1990), *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*.
- Woolfe M., Primrose S., (2004), *Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud*.
- Zietkiewicz E., (1994), *Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification*.
- Zouros, E., Freeman, K.R., Ball, A.O., Pogson, G.H. (1992). *Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel Mytilus*. Nature.

Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία (Ιστοσελίδες)

- *Animal breeding : Quality Biodiversity Innovation Competitiveness*.

http://www2.inab.certh.gr/?page_id=349&lang=en

- *Traces of pork DNA found in Halal prison meat. (2013)*

<https://www.bbc.com/news/uk-21302925>